

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
UFR DE BIOLOGIE**

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I

**Discipline : Biologie Cellulaire
Spécialité : Neurobiologie**

Présentée et soutenue publiquement par

Eric RAPONI

Le 13 décembre 2005

L'expression séquentielle des calcioprotéines S100A1 et SB100B dans les cellules gliales du système nerveux central caractérise différents stades développementaux en relation avec leurs potentialités de différenciation.

Directeur de thèse : Dr. Jean-Christophe DELOULME

Membres du Jury :

Président et examinateur : Pr. François BERGER

Rapporteurs : Dr. Hervé CHNEIWEISS

Dr. Vincent PREVOT

Examineur : Dr. Jean-Christophe DELOULME

**Thèse réalisée au sein du laboratoire Transduction du signal INSERM EMI0104 dirigé par
Jacques Baudier**

SOMMAIRE

Liste des abréviations	3
Liste des Figures	5
Avant-propos	9

INTRODUCTION

1 Historique et généralité sur les protéines S100	15
2 Les protéines S100A1 et S100B	17
2.1 Le gène et la régulation transcriptionnelle	18
2.2 Localisations tissulaires et cellulaires des protéines S100A1 et S100B	20
2.2.1 Profil d'expression des protéines S100A1 et S100B dans le système nerveux central	20
2.2.2 Profil d'expression des protéines S100A1 et S100B dans les tissus périphériques	21
2.2.3 Localisations subcellulaires	22
2.3 Considérations Structurales	22
2.3.1 Liaison au calcium	22
2.3.2 Liaison au Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}	23
2.4 Rôles intracellulaires putatifs	25
2.4.1 Régulation d'activités enzymatiques	25
2.4.2 Régulation de l'homéostasie calcique	26
2.4.3 Régulation de la dynamique du cytosquelette	27
2.4.4 Régulation de l'activité de facteurs de transcription	27
2.5 Rôles extracellulaires autocrines et paracrines putatifs	27
2.5.1 De la protéine S100B	27
2.5.2 De la protéine S100A1	29
3 Le développement du lignage oligodendrocytaire	31
3.1 Du précurseur à l'oligodendrocyte mature	33
3.1.1 Le précurseur oligodendrocytaire	33
3.1.2 Les cellules progénitrices d'oligodendrocytes	35
3.1.3 Le pro-oligodendrocyte et le pré-oligodendrocyte	38
3.1.4 L'oligodendrocyte mature myélinisant	38
3.2 Les facteurs de régulation extrinsèques	39
3.3 Origine des oligodendrocytes de la moelle épinière	42
3.4 Origine des oligodendrocytes du télencéphale	46
4 Les cellules souches neurales du système nerveux central adulte	48
4.1 Introduction	48
4.2 La neurogenèse chez les mammifères adultes	52
4.2.1 La zone sous ventriculaire adulte	52
4.2.2 La zone sous granulaire de l'hippocampe adulte	57
4.3 Les précurseurs primaires neuraux au cours du développement embryonnaire et post-natal	60
4.3.1 La glie radiale : morphologie et caractéristiques astrogliales	60

4.3.2	La glie radiale : Des précurseurs neuraux du cerveau en développement	64
4.3.3	Les cellules souches neurales : un continuum de l'embryon à l'adulte ?	67
4.4	Mécanismes moléculaires contrôlant la zone sous ventriculaire adulte	70
4.5	La zone sous ventriculaire adulte : une "niche" favorable à la neurogenèse adulte ?	74
4.5.1	Relation neurogenèse/vascularisation	75
4.5.2	Relation neurogenèse/cellules épendymaires	75
4.5.3	Relation neurogenèse/cellules astrocytaires	75
4.5.4	Relation neurogenèse/signalisation Notch	76
4.5.5	Relation neurogenèse/signalisation Shh	76
4.5.6	Relation neurogenèse/signalisation EGF	76

RESULTATS

5	Objectifs de la thèse	81
6	Etude des calciprotéines S100B et S100A1 dans la lignée oligodendrogliale	84
6.1	Article N°1 : L'expression de la protéine S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogliales corrèle avec leur entrée en différenciation oligodendrocytaire et module leur maturation	84
6.1.1	Introduction	84
6.1.2	Discussion	90
6.2	Etude de l'expression de la calciprotéine S100A1 dans la lignée oligodendrogliale du télencéphale	94
6.2.1	Etude <i>in vivo</i>	94
6.2.2	Etude <i>in vitro</i>	97
6.3	Génération de souris doublement invalidées pour les gènes <i>s100a1</i> et <i>s100b</i>	99
7	Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des astrocytes de la zone sous ventriculaire adulte	103
7.1	Article N°2 : L'EGF préserve le potentiel de cellule souche neurale des astrocytes en les maintenant dans un stade de développement immature S100B négatif.	103
7.1.1	Introduction	103
7.1.2	Article	106
7.1.3	Discussion	138
7.2	Mécanismes moléculaires contrôlant l'activation des astrocytes germinatifs.	144
7.2.1	Rôle de Mash1 dans le télencéphale	144
7.2.2	Continuum d'expression de Mash1 de la glie radiale aux astrocytes de la SVZ	145
7.2.3	Expression de Mash1 après irradiation du SNC adulte	149
7.2.4	Expression de Mash1 dans les astrocytes en culture et en neurosphère	154
7.2.5	Aspect fonctionnel de Mash1 : Mise au point de siRNA, de shRNA et de virus anti-Mash1.	157
8	Conclusion et Perspectives	163
9	References:	169

Liste des abréviations

- AEP** : Antero Endo Peduncular
- AMPc** : Adénosine 3', 5' Mono Phosphate cyclique
- ARNm** : Acide Ribo Nucléique messenger
- bFGF** : basic Fibroblast Growth Factor
- BLBP** : Brain Lipid Binding Protein
- CNPase** : 2, 3 Cyclic Nucléotide 3 Phosphohydrolase
- CNTF** : Ciliary Neurotrophic Factor
- DCX** : Doublecortine
- EGF** : Epidermal Growth Factor
- EGFP** : Enhanced Green Fluorescent Protein
- ES cells** : Embryonic stem cells
- GNDF** : Glial Derived Neurotrophic Factor
- GFAP** : Glial Fibrillary Acidic Protein
- GGF** : Glial Growth Factor
- GLAST** : Glutamate Astrocyte Specific Transporter
- IGF** : Insulin Growth Factor
- IL** : Inter Leukine
- INF** gamma : Interferon gamma
- iNOS** : inductible Nitric Oxyde Synthase
- KO** : Knock out
- LIF** : Leukemia Inhibitor Factor
- Mash1** : Mammalian achaete scute Homolog 1
- MBP** : Myelin Basic Protein
- N-CAM** : Neural Cell Adhesion Molecule
- NeuN** : Neuronal Nuclei protein
- NGF** : Nerve Growth Factor
- Ngn** : Neurogenin
- NSC** : Neural Stem Cells
- NT-3** : Neurotrophin-3
- OPC** : Oligodendrocyte Progenitor cells
- PDGF** : Platelet derived Growth Factor
- PKC** : Protein Kinase C

- PLC** : Phospholipase C
- PLP** : ProteoLipid Protein
- PN** : Post-natal
- PSA-NCAM** : Poly Sialic Acid-NCAM
- RAGE** : Receptor for Advanced Glycation End product
- RC2** : Radial Cell antigen 2
- RMS** : Rostral Migratory Stream
- RNA** : Ribonucleic Acid
- SGL** : Sub Granular Layer
- Shh** : Sonic Hedgehog
- Sh RNA** : short Harpin RNA
- Si RNA** : Small interference RNA
- SNC** : Système Nerveux Central
- SVZ** : Sub Ventricular Zone
- TGF** : Transforming Growth Factor
- TNF** : Tumor Necrosis Factor

Liste des Figures

Figure 1: Organisation des gènes <i>s100a</i> sur le chromosome 1 humain	17
Figure 2: Représentation schématique des gènes <i>s100</i> et de la structure secondaire de la protéine monomérique S100	19
Figure 3: Structures des formes "Apo" (en absence de calcium) (A) et "Holo" (en présence de calcium) (B) du dimère de S100B	24
Figure 4: Représentation schématiques des rôles intracellulaires et extracellulaires des protéines S100	30
Figure 5: Stade de développement du lignage oligodendrocytaire	32
Figure 6: Les oligodendrocytes de la moelle épinière pourraient aussi provenir d'un précurseur glial restreint, ou GRP	43
Figure 7 : Les oligodendrocytes de la moelle épinière sont produit séquentiellement dans la région ventrale puis dorsale	45
Figure 8: Evolution des modèles représentant le lignage des cellules neurales du SNC au cours du développement embryonnaire	51
Figure 9: Organisation de la zone sous ventriculaire (SVZ) adulte	56
Figure 10: Organisation de la zone sous granulaire (SGL) de l'hippocampe adulte	59
Figure 11: Transformation séquentielle de la glie radiale en astrocytes	62
Figure 12 : Formation de cellules gliales à partir de progéniteurs gliaux de la zone sous ventriculaire	63

Figure 13: La glie radiale génère des neurones au cours du développement	65
Figure 14: La glie radiale génère par division asymétrique des progéniteurs intermédiaires qui se divisent de façon symétrique	66
Figure 15: Mécanismes d'action des facteurs de transcription bHLH et sites de liaison à l'ADN	71
Figure 16 : Expression de la protéine S100A1 dans le lignage oligodendrocytaire de l'embryon à l'adulte	96
Figure 17: Expression de la protéine S100A1 au cours de la maturation oligodendrocytaire	98
Figure 18 : Expression des protéines GFAP, MBP et NG2 dans des souris adultes sauvages ou invalidées pour les gènes <i>s100a1</i> et <i>s100b</i>	100
Figure 19 : Comparaison des astrocytes GFAP positifs et des neuroblastes PSA-NCAM positifs dans les zones germinatives adultes de souris sauvages ou invalidées pour les gènes <i>s100a1</i> et <i>s100b</i>	101
Figure 20 : Etude des cellules oligodendrocytaires adultes chez des souris sauvages ou doublement invalidées pour les gènes <i>s100a1</i> et <i>s100b</i>	102
Figure 21 : Expression de Mash1 de l' embryon au stade adulte	147
Figure 22: Expression de Mash1 dans les astrocytes des zones germinatives adultes	148
Figure 23. Modèle de déplétion des cellules proliférantes de la zone sous ventriculaire adulte	149
Figure 24. Time course du repeuplement de la zone sous ventriculaire (SVZ) et de la voie de migration rostrale (RMS) adulte après irradiation	151

Figure 25 : Mash1 est massivement exprimé dans les astrocytes de type B consécutivement à une irradiation	153
Figure 26: Culture d'astrocytes en monocouche	154
Figure 27 : Les astrocytes en neurosphères expriment transitoirement le facteur de transcription Mash1	156
Figure 28 : Test de l'efficacité des siRNA anti Mash1 murin	158

Avant Propos

Depuis la découverte en 1998 de paramètres expérimentaux permettant de cultiver des cellules souches humaines, celles-ci occupent le devant de la scène scientifique mais aussi médiatique. L'engouement des scientifiques, des industriels et du public s'explique par le fait que ces cellules suscitent à la fois de très nombreux espoirs dans le traitement de maladies jusqu'alors incurables, mais aussi de très nombreuses craintes quant au cadre législatif de leur utilisation.

Les cellules souches sont communément considérées comme des cellules fonctionnellement et phénotypiquement très indifférenciées. Elles sont présentes chez l'embryon, le fœtus ainsi que chez l'adulte où elles génèrent tout un panel de cellules spécialisées participant au développement puis à l'homéostasie de l'organe considéré. De plus, elles conservent leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciations multiples, *in vitro*. Ainsi, de nombreux scientifiques ont entrevu le potentiel curatif considérable de ces cellules. Dès lors, des transplantations de cellules dans certaines affections hématologiques avec la greffe de cellules souches de la moelle osseuse ou chez les grands brûlés avec les greffes de peau, ont été réalisées avec succès, renforçant l'idée d'un grand potentiel thérapeutique de ces cellules : la thérapie cellulaire était née. On imagine déjà des greffes de cellules hépatiques, pancréatiques, cardiaques ou nerveuses pour soigner d'innombrables pathologies allant du diabète aux maladies neurodégénératives. Cependant, malgré ces résultats extrêmement prometteurs, l'emploi quotidien de cellules souches en thérapie ne va pas de soi. Tout d'abord, d'un point de vue purement scientifique, on connaît très peu de choses sur le fonctionnement de ces cellules. Quels sont les signaux qui contrôlent leur prolifération, différenciation et spécification cellulaire, qui les font correctement s'intégrer dans l'organe hôte ou qui évitent que ces cellules réimplantées deviennent tumorales ? Toutes ces questions, en voie de découverte constante, restent encore largement méconnues et empêchent, pour l'instant, leur utilisation courante en clinique. D'autre part, et c'est là que des problèmes éthiques viennent se rajouter, quelle source de cellules souches peut-on utiliser pour soigner un patient ? Trois possibilités majeures s'offrent à nous : 1) **les cellules souches embryonnaires**. Les cellules souches de l'embryon possèdent, en effet, la capacité de se répliquer indéfiniment en culture tout en conservant leur capacité de

différenciations multiples et elles peuvent se conserver à long terme par congélation. Ces cellules présentent ainsi des propriétés idéales dans le cadre de thérapies cellulaires. Cependant l'utilisation clinique de ce type de cellules est actuellement au centre de houleux débats éthiques et philosophiques. La recherche sur ces cellules permettant le "clonage thérapeutique" conduirait inévitablement au clonage humain (clonage reproductif) 2) **les cellules souches d'origine fœtale**. Ces cellules proviennent de fœtus suite à une interruption volontaire de grossesse. Cependant, leur disponibilité est relativement limitée et le nombre de cellules souches fœtales est faible ; leur utilisation est peu envisageable pour des thérapies régénératrices de masse 3) **les cellules souches adultes**, présentes au sein même de l'organe considéré. Comme les cellules souches embryonnaires, ces cellules sont aussi capables d'auto-renouvellement et de différenciations multiples *in vitro* et *in vivo*. Elles ouvrent ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques sans qu'aucun problème de compatibilité ou d'éthique ne se pose. Cependant, leur accessibilité, leur nombre, leur activation ou leur migration vers les sites lésés sont quelques uns des problèmes non résolus à l'heure actuelle. Des études approfondies sur les mécanismes biologiques permettant de comprendre et maîtriser ces cellules endogènes sont actuellement en cours dans de nombreux laboratoires publics mais aussi privés, à travers le monde.

Une alternative aux cellules souches, et constituant une quatrième possibilité thérapeutique, concernerait l'utilisation de cellules progénitrices. Les cellules progénitrices diffèrent énormément des cellules souches. En effet, elles ont perdu leur potentialité d'auto-renouvellement et de différenciations multiples. Ainsi, elles ne peuvent générer qu'une catégorie cellulaire précise et ne peuvent pas être maintenues à long terme, en culture ; cependant elles sont présentes dans l'organe considéré. Leur utilisation en médecine, nécessitera donc une action directe, *in situ*. La stratégie thérapeutique s'apparenterait à celle qui serait utilisée pour les cellules souches adultes. La connaissance des mécanismes contrôlant ces cellules est, là aussi, essentielle si l'on veut les utiliser à des fins thérapeutiques.

Il est clair que le choix des futures cellules souches ou progénitrices que l'on utilisera en médecine régénératrice est un vif sujet de discussion avec des implications scientifiques mais aussi religieuses, politiques, éthiques et bien sûr économiques. Cependant, il est important de prendre conscience qu'actuellement on est encore loin de connaître et maîtriser ces cellules, quelles qu'elles soient, et de ce fait il est encore impossible d'affirmer que ces cellules seront effectivement utilisables dans le cadre de thérapies cellulaires. C'est pourquoi, la recherche fondamentale visant à comprendre la biologie de ces cellules est un pré-requis indispensable afin d'évaluer par la suite, le champ thérapeutique réel des différents types de cellules souches et/ou progénitrices.

Dans le laboratoire, nous nous intéressons au fonctionnement des cellules souches/progénitrices adultes. Plus particulièrement, nous cherchons à identifier les événements contrôlant la différenciation, maturation, spécification de ces cellules dans le système nerveux central adulte ainsi que les mécanismes permettant la conservation de leurs propriétés. Nos recherches utilisent pour cela des modèles de cultures de cellules du cerveau mais aussi des approches *in vivo*, le tout utilisant la souris comme modèle d'étude. L'objectif étant d'arriver à terme à mieux comprendre comment une cellule souche/progénitrice fonctionne au sein d'un système intégré. Ces informations seront nécessaires pour d'autres équipes de recherche cherchant à "maîtriser" ces cellules pour les utiliser en médecine régénératrice.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons cherché à déterminer quels étaient les événements cellulaires impliqués dans la régulation de la maturation des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC) adultes. En effet, les oligodendrocytes (cellules myélinisantes du système nerveux central) sont détruites au cours de maladies démyélinisantes (par exemple : la sclérose en plaques). Cependant au cours de cette pathologie, les OPC adultes, bien que présentes, deviennent incapables d'amorcer leur maturation cellulaire afin de se "transformer" en oligodendrocytes matures myélinisants. Si les OPC adultes suscitent de grands espoirs thérapeutiques dans le cadre de maladies démyélinisantes, les mécanismes gouvernant leur maturation cellulaire doivent être déterminés. Utilisant des approches *in vitro*, *in vivo*, un modèle inductible de démyélinisation et une lignée de souris invalidées pour le gène *s100b*, nous avons démontré que la protéine S100B

s'exprime dans les OPC en voie de transformation oligodendrocytaire et régule leur maturation. Ces résultats permettent d'identifier la protéine S100B comme un acteur moléculaire impliqué dans la maturation des OPC en oligodendrocytes matures myélinisants soit de façon physiologique soit à la suite de démyélinisations.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux cellules souches neurales adultes. En effet, de récents résultats obtenus par différents laboratoires démontrent que les cellules souches neurales adultes présentent des caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales d'astrocytes. Ces résultats troublants posent des questions fondamentales concernant la nature même de ces cellules souches et notamment en quoi elles diffèrent des autres astrocytes du cerveau. Utilisant des approches *in vitro*, *in vivo*, des transplantations cellulaires et une lignée de souris transgéniques exprimant un gène rapporteur fluorescent sous le promoteur du gène *s100b*, nous avons déterminé que les cellules souches neurales adultes sont des astrocytes maintenus dans un état d'immaturité grâce à un composant microenvironnemental, l'EGF. Ces résultats fournissent des informations fondamentales sur 1) la régulation du développement et la nature des cellules souches neurales astrocytaires 2) Mécanismes permettant le maintien des potentialités des astrocytes germinatifs adultes 3) le décryptage des différentes phases du développement astrocytaire.

Au cours de cette thèse je vous présenterais les résultats obtenus dans ce cadre de recherche. Tout d'abord, je vous replacerais les données bibliographiques sur les calcioprotéines S100, sur les cellules progénitrices oligodendrogiales ainsi que sur les cellules souches neurales adultes. Ensuite, je vous présenterais de façon détaillée, tous les différents résultats obtenus durant cette thèse et concernant ces deux catégories de cellules souches et progénitrices. Enfin, chacun de ces résultats seront discutés et mis en perspectives .

INTRODUCTION

1 Historique et généralité sur les protéines S100

Afin de découvrir des protéines essentielles au fonctionnement du système nerveux central (SNC), Moore et McGregor ont mis au point, en 1965, une technique de fractionnement à partir d'extraits totaux de cerveaux de bœuf. Ils ont ainsi pu isoler une fraction subcellulaire, soluble dans une solution de 100% de sulfate d'ammonium à pH neutre, qu'ils ont logiquement nommé "S100" (Moore, 1965). Les protéines contenues dans cette fraction résultent de l'assemblage de deux sous unités protéiques, nommées $\alpha/A1$ et β/B , s'assemblant en homo et hétérodimères (Isobe et al., 1977). Le séquençage de ces sous unités a révélé une très grande homologie de séquence primaire ainsi que la présence, à l'intérieur de chacune d'entre elles, de deux sites de liaison au calcium de type "EF-hand" (Isobe et al., 1978). Basé sur ces critères d'homologies de séquences et de structures, près de 21 protéines S100 ont pu être identifiées et constituent une nouvelle famille au sein des calcioprotéines à motif EF-hand. Ceci suggère que toutes ces protéines ont évolué à partir d'un gène ancestral disposant d'un motif biochimique fonctionnel. Les études phylogénétiques ont, par ailleurs, montré que cette famille apparaît tardivement au cours de l'évolution puisque les protéines S100 sont exprimées uniquement chez les vertébrés (Donato, 2001).

Chez l'homme, les gènes des isoformes S100A1 à S100A14 sont regroupés en position q21 du chromosome 1 (Figure 1). La proximité physique de ces gènes est à l'origine de leur nomenclature officielle ; la lettre A correspondant au complexe multigénique et le chiffre qui suit à la position relative de chaque gène (Pietas et al., 2002; Schafer et al., 1995). Les gènes humains des protéines S100P et S100B sont quant à eux localisés sur les chromosomes 4 et 21 respectivement (Morii et al., 1991; Schafer et al., 1995).

Les protéines S100 sont de petites protéines agencées en dimère et dont le poids moléculaire d'une sous-unité est compris entre 9 et 14 kilodaltons (Zimmer et al., 1996; Zimmer et al., 1995). La plupart des S100 (S100A4, A6, A7, A8, A10, A11, A12 et S100B) existent sous forme d'homodimères. Cependant, elles peuvent aussi former des hétérodimères, comme c'est le cas pour S100A1 et S100B, S100A1 et

S100A4, S100A6 et S100B, S100A11 et S100B ainsi que S100A8 et S100A9 (Deloulme et al., 2000; Hunter and Chazin, 1998; Isobe et al., 1981; Yang et al., 1999). Chaque sous-unité est caractérisée par la présence de deux motifs EF-hand. Les motifs EF-hand, composés de deux hélices alpha reliées par une boucle, sont connectés par une région intermédiaire faisant office de charnière (Figure 2) (Donato, 2001) et permettent la fixation du calcium.

Par homologie avec la calmoduline, un autre membre des calciprotéines à motif EF-hand, les protéines S100 sont souvent considérées comme des senseurs du calcium. L'élévation du calcium intracellulaire conduirait à l'activation des S100 qui adopteraient un changement de conformation leur permettant d'interagir avec leurs partenaires au sein de la cellule (Figure 3). Cependant, la participation des S100 dans la voie de signalisation calcique n'a jamais été formellement établie. Outre leur structure quaternaire, les protéines S100 se différencient de la calmoduline par une plus faible affinité pour le calcium et par leur capacité à fixer d'autres métaux divalents comme Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Alu^{2+} .

Les fonctions intracellulaires des protéines S100 ont été très bien documentées et vont de l'inhibition de la phosphorylation de protéines cibles à la régulation d'activité enzymatique en passant par l'interaction avec des éléments du cytosquelette et la régulation de l'homéostasie calcique (Figure 4). Toutefois ces études ont été principalement réalisées *in vitro*, et malheureusement leur fonction *in vivo* est encore largement méconnue.

Plus récemment, il a été montré que certaines S100 peuvent aussi avoir une fonction extracellulaire. Cependant, si une action extracellulaire a bien été décrite pour les isoformes A1, A2, A4, A7, A8, A9, A10, A12 et B, seule la sécrétion des protéines S100A8, A9 et B a pu être mise en évidence. Ces effets extracellulaires varient suivant les isoformes et les concentrations utilisées (Figure 4) (Donato, 2001).

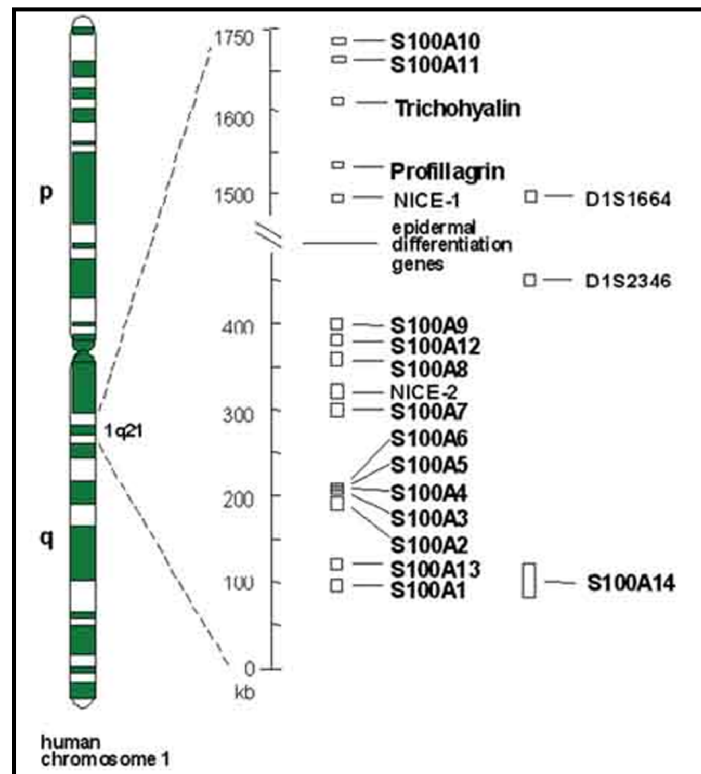


Figure 1: Organisation des gènes *s100a* sur le chromosome 1 humain.

Les gènes sont tous regroupés dans la région 1q21 de ce chromosome (d'après Schafer et al., 1996).

2 Les protéines S100A1 et S100B

La protéine S100A1 et la protéine S100B sont les deux S100 les plus étudiées probablement en raison de l'ancienneté de leur découverte. Cependant, des deux protéines, la S100B suscite beaucoup plus d'intérêt du fait de la localisation de son gène sur le chromosome humain 21. Chez les malades atteints de la trisomie 21, la sur-expression de S100B dans les astrocytes et la microglie semble être corrélée à la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau (Stanley et al., 1994). Par ailleurs, une sur-expression de S100B est aussi observée dans le cerveau de malades atteints de la maladie d'Alzheimer ou du SIDA (Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1995; Marshak et al., 1992; Mrak et al., 1996; Sheng et al., 1996). Ces observations suggèrent que la S100B pourrait participer au développement neuropathologique de ces maladies. Contrairement à la S100B et la S100P, le gène

de la S100A1 se situe, chez l'homme, sur le chromosome 1 dans la région q21, regroupé en grappe avec d'autres gènes de S100 (Figure 1). Plusieurs réarrangements et délétions de cette région chromosomale ont été décrits au cours du développement tumoral et semble être à l'origine des dérégulations de l'expression de ces S100 observées dans de multiples cancers. Plusieurs de ces S100 comme la S100A6, S100A2 et la S100A4 sont couramment utilisées par les anapathologistes dans le diagnostic de certains cancers comme celui de la peau ou du cerveau (Cochran et al., 1993; Schafer and Heizmann, 1996).

2.1 Le gène et la régulation transcriptionnelle

Les gènes de la S100A1 et S100B sont très conservés d'une espèce à l'autre avec, par exemple, 85% d'identité entre les formes exprimées chez le rat et l'homme. Les gènes codant pour les protéines S100B et S100A1 présentent des caractéristiques communes avec les autres membres de la famille des S100 (Figure 2). En effet, l'organisation générale des gènes codant pour les différentes isoformes S100 est extrêmement conservée ; tous ces gènes étant strictement composés de 3 exons et de deux introns (Kiewitz et al., 2000). L'exon I code pour des séquences 5' non traduites, alors que l'exon II contient à la fois une séquence 5' non traduites et l'extrémité N-terminale du premier motif EF-hand . Le second motif EF-hand ainsi que la partie C-terminale traduite et non traduite se situent tous deux dans l'exon III (Figure 2). Finalement, d'autres éléments caractérisent les gènes de la famille des S100 tels que l'élément SPE (*S100 Protéin Element*) situé dans la région promotrice de tous les gènes codant pour les protéines S100 et dont la fonction reste encore inconnue (Stuve and Myers, 1990; Zimmer et al., 1996).

Malgré ces nombreuses similitudes, le patron d'expression tissulaire et cellulaire de chaque S100 est tout de même très spécifique. Les éléments et séquences promotrices responsables de cette spécificité restent encore largement méconnus. Cependant des éléments importants situés sur les séquences promotrices des gènes codant pour les protéines S100A1 et la S100B et reconnus par les facteurs de transcriptions CREB et AP2, pourraient expliquer certains effets *in vitro* observés lors de traitements capables de stimuler l'élévation d'AMPc (Roesler et al., 1988). Un analogue de l'AMPc, le dibutryl AMPc qui stimule la maturation des

cellules gliales C6 et des astrocytes en culture, augment aussi la quantité des messagers codant pour les protéines S100A1 et S100B (Kahn et al., 1991; Labourdette and Mandel, 1980). Par ailleurs, les glucocorticoides, comme la dexaméthasone et la protéine β -amyloïde, stimulent la synthèse de l'ARNm codant pour la protéine S100B, alors qu'elle est réprimé sous influence de l'IL1b (*interleukine 1b*) et du bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Mrak and Griffinbc, 2001). *In vitro*, il a aussi été démontré que l'expression de la protéine S100A1 était augmentée en réponse à la différenciation des cellules neuronales ou musculaires, par le facteur de croissance neuronal NGF (*Nerve Growth Factor*, Zimmer et al., 1995).

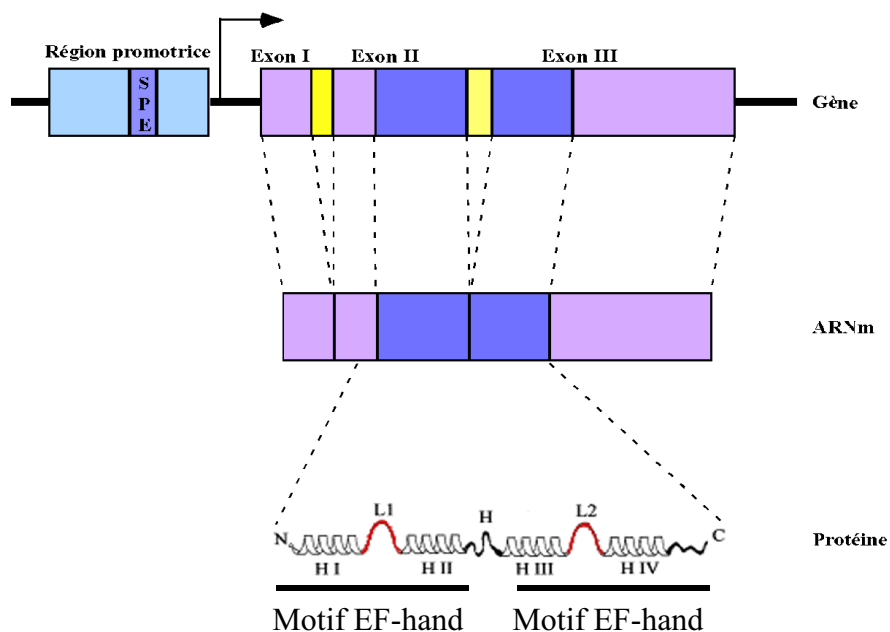


Figure 2: Représentation schématique des gènes *s100* et de la structure secondaire de la protéine monomérique S100.

Le gène *s100* est composé de trois exons (en mauve : exons transcrits mais non traduits et en violet : exons transcrits et traduits) séparés par deux introns (en jaune). Les régions 5' et 3' non traduites sont représentées en mauve. La protéine formée possède des boucles de liaison au calcium (L1 dans la moitié N-terminale et L2 dans la moitié C-terminale) flanquées de deux hélices alpha (H1 H11 pour L1 et HIII HIV pour L2). Une région intermédiaire (hinge, H) connecte les deux hélices. L'hélice IV est suivie d'une petite extension C-terminale. SPE: *S100 Protein Element*.

2.2 Localisations tissulaires et cellulaires des protéines S100A1 et S100B

Les études sur la localisation tissulaire mais surtout cellulaire des protéines S100A1 et S100B sont nombreuses et pour certaines controversées voire contradictoires. Ces controverses et contradictions sont essentiellement dues au fait que les premiers anticorps générés contre la fraction "S100" du cerveau reconnaissent aussi bien la S100B que la S100A1 mais aussi pour certains anticorps d'autres membres de la famille des S100 (Scahfer et al., 1996). Encore aujourd'hui, le terme de protéine "S100" dans le système nerveux central (SNC) est souvent considéré, à tort, comme synonyme de protéine S100B. Depuis, d'autres membres de la famille des S100 ont été caractérisés dans le cerveau comme la S100A2, S100A4 et S100A6 (Donato, 2001). Cependant, comme nous le verrons plus loin (article N°1 et 2), seul l'utilisation de souris invalidées pour le gène codant pour la protéine S100 considérée peut indiscutablement valider la spécificité des anticorps.

2.2.1 Profil d'expression des protéines S100A1 et S100B dans le système nerveux central

Le système nerveux central est formé par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et la moelle épinière. Il est constitué de neurones, de cellules gliales et de capillaires sanguins. Il existe quatre variétés de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires ainsi que les cellules microgliales.

La majorité des études concernant l'expression des protéines S100 dans le SNC a été réalisée au niveau du cerveau (Yoshikawa et al., 2000). Chez l'homme, le marquage "S100" apparaît précocement, après 10 semaines de gestation, et son intensité augmente tout au long de la vie (Zuckerman et al., 1970). Ce phénomène est également observé chez les rongeurs (Landry et al., 1989).

Au cours du développement, une progression postéro-antérieure du signal A1/B (ou "S100") est détectée dans les cellules gliales du cerveau (Sarnat, 1992; Yang et al., 1995a; Yang et al., 1995b). Les cellules S100 positives sont souvent cataloguées comme cellules astrogliales uniquement sur la base de leur morphologie (Landry et al., 1989; Yang et al., 1995b). La ligne médiane du raphé, structure gliale radiaire présente transitoirement du 15^{ème} jour embryonnaire (E15) au 8^{ème} jour post-

natal (PN8) chez les rongeurs (Gomez et al., 1990; Van Hartesveldt et al., 1986), ainsi que d'autres glies radiaires, comme celle responsable de la migration des neurones de Purkinje du cervelet de E13 à PN2, chez le hamster possèdent également un immunomarquage "S100" (Sievers et al., 1994).

Au stade adulte, un signal anti "S100" a été détecté, *in vivo* et *in vitro*, dans différentes cellules comprenant principalement les astrocytes et dans une moindre mesure, les épendymocytes et certaines sous-populations de neurones et d'oligodendrocytes myélinisants (Rickmann and Wolff, 1995a; Rickmann and Wolff, 1995b; Yang et al., 1995a; Yang et al., 1995b). Néanmoins, la présence d'un fort signal "S100" dans les astrocytes fibreux et protoplasmiques (Cocchia, 1981) associé au fait que la protéine S100B est la protéine S100 majoritaire du SNC, est à l'origine de l'idée très répandue 1) que la protéine S100B est un marqueur spécifique des astrocytes dans différentes espèces et 2) que le signal "S100" se superpose parfaitement au signal S100B (Melzer et al., 1997; Savchenko et al., 2000; Zhang and McKanna, 1997). Cependant, comme nous le verrons plus loin dans cette thèse, cette idée est en partie fausse.

Il est important de souligner qu'un signal "S100" a également été observé dans des cellules gliales spécialisées chez l'adulte, mais ayant conservé certaines caractéristiques d'immaturité. Ces cellules correspondent à la glie de Bergmann au niveau du cervelet (Landry et al., 1989), aux cellules de Müller de la rétine (Das et al., 1984; Rambotti et al., 1999), ainsi qu'aux tanocytes du 3^{ème} ventricule (Chouaf et al., 1991; Perez-Martin et al., 2000; Shariful Islam et al., 1998).

Au niveau du SNC, l'expression spatio-temporelle de la protéine S100A1 a été très peu étudiée. Toutefois, une expression neuronale ainsi qu'astrocytaire a été décrite *in vivo* au cours du développement postnatal ainsi que chez l'adulte (Isobe et al., 1984; Kahn et al., 1997).

2.2.2 Profil d'expression des protéines S100A1 et S100B dans les tissus périphériques

Si la S100B est très fortement exprimée dans le cerveau et les testicules, elle est aussi exprimée à de moindres niveaux dans le tissu adipeux brun et blanc, la vessie, le colon, l'intestin grêle, le pancréas et la peau ; la rate, l'utérus ou le poumon n'exprimant quasiment pas la protéine (Zimmer et al., 1996). Les tissus contenant du

cartilage, comme la trachée et les os, sont susceptibles de contenir de la S100B (Landry et al., 1990). L'expression de la protéine dans un tissu est souvent limitée à quelques types cellulaires, ainsi dans la glande salivaire, seule les cellules myoépithéliales entourant les acini et les cellules des conduits intercalés sont positifs à la S100 (Hara et al., 1983).

La protéine S100A1, au même titre que la S100B, n'est pas spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire particulier. Des études par Northern blot ont ainsi démontré la présence d'ARN messager codant pour la S100A1 dans divers tissus tel le cœur et la glande submaxillaire, où le signal est fort, ainsi que le muscle squelettique adulte, les reins, la rate, la glande thyroïdienne et le cerveau, où le signal est plus faible (Kiewitz et al., 2000).

2.2.3 Localisations subcellulaires

Les protéines S100A1 et S100B ne se distribuent pas uniformément dans la cellule, elles sont majoritairement cytoplasmiques et dans certains cas nucléaires comme dans les astrocytes. Dans certaines études, elles ont aussi été décrites comme étant associées à des filaments intermédiaires en microscopie électronique (Davey et al., 2001; Hara et al., 1983). Ainsi, leur localisation subcellulaire varie selon le type cellulaire considéré, au niveau des astrocytes par exemple, qui forment des pieds astrocytaires enveloppant les vaisseaux, les deux protéines présentent un marquage nucléocytoplasmique classique mais présentent aussi une nette accumulation dans les pieds astrocytaires. La S100B peut aussi être associée aux membranes nucléaire, mitochondriale, plasmique, et golgienne (Davey et al., 2001; Hara et al., 1983).

2.3 Considérations Structurales

2.3.1 Liaison au calcium

Les protéines S100A1 et S100B se retrouvent principalement sous la forme d'un dimère parfaitement symétrique (Figure 3) (Donato, 2001). Leur liaison au calcium imprime des changements de leur conformation se traduisant par la réorientation de l'hélice III (Donato, 2001; Heizmann and Cox, 1998). La S100A1 et la S100B peuvent

lier 4 ions calcium par dimère avec des affinités différentes (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986). En effet, le site EF-hand N-terminal est de faible affinité ($K_d=200-500\mu\text{M}$), tandis que le site EF-hand en C-terminal est de plus haute affinité ($K_d=10-20\mu\text{M}$) (Baudier and Cole, 1989). Cependant ces affinités sont extrêmement faibles comparées aux motifs EF-hand de la calmoduline ($K_d=0.1\mu\text{M}$ et $1\mu\text{M}$). Ceci suggère soit que les protéines S100A1 et S100B ne fixent pas le calcium *in vivo*, soit que des co-facteurs sont nécessaires à leur activité de senseurs du calcium intracellulaire.

2.3.2 Liaison au Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}

La protéine S100B est sujette à l'influence du zinc sur son affinité vis à vis du calcium. Elle dispose de 3-4 sites de liaison au zinc par monomère et le zinc permet d'augmenter l'affinité de la S100B pour le calcium (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986). La fixation de zinc sur les deux premiers sites entraîne un changement de conformation de la S100B qui se traduit en un effet coopératif sur la fixation du calcium (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986). Le magnésium (Mg^{2+}) a quant à lui un effet opposé et ne favorise pas la liaison du calcium sur la S100B (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986).

La protéine S100A1 peut elle aussi fixer les ions zinc, avec une plus grande affinité que la protéine S100B. Cependant, des tests de fixation du calcium sur la protéine S100A1 ayant déjà fixé du zinc, démontrent que les sites de fixation aux différents ions sont distincts et n'agissent pas de manière coopérative (Baudier and Gerard, 1986; Baudier et al., 1986).

Parmi les métaux, la S100B est aussi capable de lier le cuivre, inhibant l'oxydation de L-ascorbate catalysée par le Cu^{2+} (Nishikawa et al., 1997). Le dimère peut en effet lier 4 ions Cu^{2+} qui sont déplacés par du zinc à $1\mu\text{M}$ suggérant qu'il s'agit des mêmes sites de liaison. Cette observation peut avoir des conséquences physiopathologiques importantes car elle suggère que la protéine S100B pourrait protéger contre le stress oxydant en séquestrant le Cu^{2+} (Shiraishi and Nishikimi, 1998). Pour mémoire, le Cu^{2+} est en effet réduit par la β -Amyloïde 4 en Cu^+ et conduit au développement de la maladie d'Alzheimer (Multhaup et al., 1996).

En recherchant des méthodes d'évaluation d'intoxication aux métaux lourds, Levy et collaborateurs démontrèrent que la S100B pouvait lier l'aluminium, tout

comme la calmoduline (Siegel et al., 1982). Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope BSA-aluminium reconnaissent aussi la S100B couplée à l'aluminium ; cette réaction est inhibée par le citrate, un chélateur de l' Al^{3+} (Levy et al., 1998). Cette observation pourrait impliquer la S100B dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, quand on sait que l'aluminium peut déclencher des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Campbell, 2002).

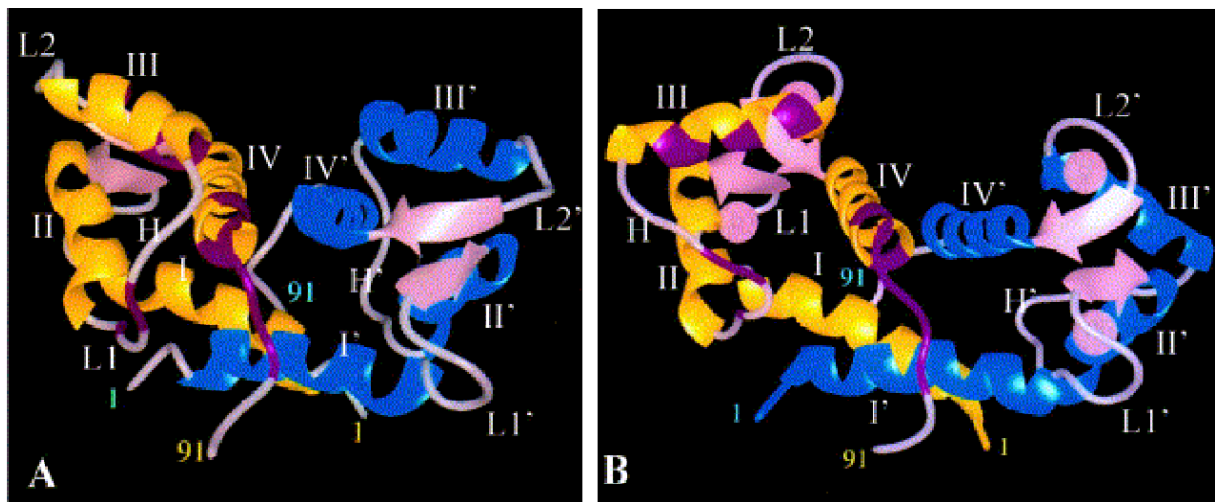


Figure 3: Structures des formes "Apo" (en absence de calcium) (A) et "Holo" (en présence de calcium) (B) du dimère de S100B.

Les monomères de S100B sont représentés en jaune et bleu. Les hélices sont indiquées en chiffres romains (I-IV et I'-IV'). La liaison du calcium sur chaque monomère induit une réorientation de l'hélice III et de la région charnière (Hinge, H) ce qui expose un certain nombre de résidus (magenta) des hélices III et IV, de la région hinge et de l'extension C-terminale au solvant. Les ions calcium sont représentés sous forme de points rose pâles à l'intérieur des boucles de liaison au calcium (L1 L2 et L1' L2') (d'après Drohat et al., 1998).

2.4 Rôles intracellulaires putatifs

Les rôles des protéines S100A1 et S100B se définissent à travers leurs protéines cibles ou à travers leurs actions dans les processus physiologiques. Aussi, la recherche de cibles de ces protéines est une voie de recherche qui fut longtemps privilégiée. Les protéines S100A1 et S100B ont, à ce titre, été impliquées dans plusieurs processus cellulaires majeurs grâce à leurs interactions, *in vitro*, avec des protéines impliquées dans la régulation d'activités enzymatiques, de l'homéostasie calcique, du cytosquelette ou de l'expression génique.

2.4.1 Régulation d'activités enzymatiques

2.4.1.1 De la protéine S100B

La S100B inhibe la phosphorylation de protéines *in vitro* en présence ou non de calcium. Cette inhibition résulte bien souvent de l'interaction de la S100B avec les substrats de protéines kinases (Wilder et al., 1998). Si les pertinences fonctionnelles de ces inhibitions et leurs corrélations fonctionnelles ne sont pas toujours établies, on peut cependant supposer que la S100B joue un rôle important dans la transduction du signal. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la S100B se lie sur les protéines cibles au niveau des sites phosphorylés par la PKC ; les substrats ne pouvant plus être phosphorylés par celle-ci (Baudier et al., 1987). Ce mécanisme d'action peut s'avérer important car la S100B jouerait ainsi un rôle d'interrupteur sur certaines voies de signalisation intracellulaire. En outre, l'action de la S100B ne se contente pas d'interagir avec les voies de signalisation en "éteignant" certaines d'entre elles, elle peut aussi réguler l'activité enzymatique d'un certain nombre d'enzymes telles la guanylate cyclase (Duda et al., 2002; Margulis et al., 1996), la fructose-1,6-bisphosphatase aldolase (Landar et al., 1996) ou la sérine/thréonine kinase Ndr (Millward et al., 1998).

2.4.1.2 De la protéine S100A1

La protéine S100A1 stimule, *in vitro*, la protéine kinase sarcomérique nommée "titine" de manière Ca^{2+} et Zn^{2+} dépendante (Heierhorst et al., 1996; Yamasaki et al., 2001). Cette protéine, comme S100B, stimule l'activité enzymatique de Ndr (Millward et al., 1998). L'activité, *in vitro*, de la guanylate cyclase est, elle aussi, stimulée par l'action de la protéine S100A1 (Duda et al., 2002; Pozdnyakov et al., 1997).

2.4.2 Régulation de l'homéostasie calcique

2.4.2.1 De la protéine S100B

L'implication de la S100B dans le contrôle de l'homéostasie calcique des cellules gliales a pu être montrée avec la génération de souris invalidées pour le gène *s100b* (Xiong et al., 2000). En effet, dans les cultures provenant d'animaux invalidés pour le gène *s100b*, l'augmentation calcique intracellulaire transitoire déclenchée par le KCl et la caféine est plus importante que dans les cultures provenant de souris sauvages. La S100B pourrait notamment agir au niveau d'un certain nombre de cellules du système nerveux afin de réguler les concentrations intracellulaires de calcium libre à travers des mécanismes impliquant l'activation de PLC et la formation d'IP3 (Barger and Van Eldik, 1992).

2.4.2.2 De la protéine S100A1

Plusieurs travaux suggèrent que la protéine S100A1 joue un rôle important dans la régulation de la contraction du myocarde. Les souris invalidées pour le gène codant pour la protéine S100A1 présentent des troubles de la contraction cardiaque lorsque celles-ci sont soumises à un stress hémodynamique chronique (Du et al., 2002). De plus, une surexpression de la protéine S100A1 dans des souris transgéniques modifie considérablement la réponse cardiaque à une stimulation adrénergique (Most et al., 2003). Ces effets sont à lier au fait qu'au niveau du réticulum sarcoplasmique, la protéine S100A1 augmente le relargage de Ca^{2+} dans les cellules du muscle cardiaque (Most et al., 2003). En effet, la liaison de la protéine S100A1

sur le récepteur de la ryanodine augmente ses probabilités d'ouverture et donc de relargage intracellulaire de Ca^{2+} (Treves et al., 1997).

2.4.3 Régulation de la dynamique du cytosquelette

Le cytosquelette est composé de plusieurs types de filaments. Les composants majeurs que sont les microtubules et les filaments intermédiaires de type III sont régulés *in vitro* par les protéines S100A1 et S100B (Garbuglia et al., 1999a; Garbuglia et al., 1999b; Sorci et al., 2000). Dans les deux cas, ces protéines favorisent l'inhibition de l'assemblage des fibres et favorisent leur dépolymerisation. La S100B joue aussi un rôle indirect sur l'activité enzymatique de l'actinomyosine ATPase, en renversant l'inhibition de cette dernière par la caldesmon et la calponine (Alexanian et al., 2001).

2.4.4 Régulation de l'activité de facteurs de transcription

Plusieurs facteurs de transcription interagissent *in vitro* avec les protéines S100A1 et S100B. Celles-ci lient en effet la séquence bHLH présente au niveau de nombreux facteurs de transcription (Onions et al., 1997). La protéine S100A1 est ainsi capable de lier les facteurs de transcriptions MyoD et E12 et d'inhiber la phosphorylation de MyoD (Baudier et al., 1995). La protéine S100B peut notamment lier la protéine suppresseur de tumeur P53 de façon calcium dépendante (Delphin et al., 1999; Ikura et al., 2002).

2.5 Rôles extracellulaires autocrines et paracrines putatifs

2.5.1 De la protéine S100B

La protéine S100B extracellulaire pourrait avoir un rôle fonctionnel non négligeable. Plusieurs études ont en effet montré des effets trophiques mais aussi toxiques dans le système nerveux central liés à la présence de S100B dans le milieu extracellulaire (Eriksen and Druse, 2001; Huttunen et al., 2000). *In vitro*, la S100B peut être sécrétée par les astrocytes, les cellules folliculostellaires, et les adipocytes sous

action de stimulateur de la lipolyse (Console et al., 2000). Il est possible que d'autres types cellulaires soient aussi capables de sécréter de la S100B.

La S100B fut d'ailleurs appelée NEF (*Neurite extension factor*). En effet, la sécrétion paracrine de S100B permet, *in vitro*, de stimuler la croissance et l'extension des neurites (Kilgman and Marshack, 1985). L'activité neurotrophique de la S100B dépendrait de la formation préalable du dimère comportant des ponts disulfures. La S100B ainsi sécrétée serait alors capable de lier le récepteur RAGE présent sur les neurones afin d'activer la translocation nucléaire du facteur NFkB conduisant, *in fine*, à l'extension des neurites et/ou à l'augmentation de l'expression du facteur anti-mitotique Bcl-2 (Alexanian et al., 2001; Huttunen et al., 2000). La S100B exercerait, en outre, un contrôle autocrine sur la prolifération astrocytaire. Elle stimulerait l'augmentation de la concentration intra-cellulaire de calcium (Barger and Van Eldik, 1992). La S100B serait également capable de stimuler la prolifération de cellules gliales *in vitro*, en favorisant la phosphorylation des MAP kinases (Goncalves et al., 2000; Selinfreund et al., 1991).

L'effet toxique de la S100B extracellulaire semble dépendre de la concentration de cette dernière. A des concentrations infimes (nanomolaire), la S100B stimule la croissance des neurites (Kligman and Marshak, 1985; Winningham-Major et al., 1989), et protège les neurones pendant le développement ou après une déprivation en glucose (Barger et al., 1995). En revanche, à des concentrations micromolaires la protéine S100B semblent plutôt avoir des effets toxiques conduisant à la mort de neurones en culture (Hu et al., 1996; Mariggio et al., 1994). A de telles doses, on retrouve la protéine S100B impliquée dans de nombreux messages délétères, en permettant l'induction et l'activation de la iNOS (Lam et al., 2001), l'induction et la sécrétion de la cytokine proinflammatoire IL-6, et en agissant en synergie avec le lipide A et l'INFgamma sur des cultures microgliales (Guo et al., 2001; Petrova et al., 2000). De ce fait, on peut imaginer que la toxicité cérébrale observée chez les patients atteints de trisomie 21, de maladie d'Alzheimer ou d'épilepsie pourrait bien être due à la présence anormalement élevée de S100B dans le milieu extra-cellulaire (Griffin et al., 1998; Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1995; Marshak et al., 1992; Mrak et al., 1996; Sheng et al., 1996). Ces données suggèrent que la S100B aurait plutôt des effets trophiques en conditions normales tandis que les effets toxiques seraient liés à des conditions pathologiques.

2.5.2 De la protéine S100A1

Actuellement, il n'y a aucune évidence de sécrétion de la protéine S100A1. Cependant, la protéine S100A1 est retrouvée dans le milieu extracellulaire lors d'un stress ischémique cardiaque (Kiewitz et al., 2000). Récemment, Most et collaborateur ont démontré que la protéine S100A1 exogène avait un rôle anti-apoptotique et cardioprotecteur : en protégeant les cardiomyocytes en culture d'un stress oxydatif (Most et al., 2003; Most et al., 2005). Par ailleurs, cette protéine exerce aussi des effets neurotrophiques, *in vitro*, sur des neurones exprimant le récepteur RAGE, comme la S100B (Huttunen et al., 2000).

En conclusion, les fonctions *in vivo* des protéines S100A1 et S100B restent encore très hypothétiques, même s'il semble évident qu'elles interagissent avec le calcium et des métaux lourds tel le zinc. En effet, la majorité des études n'ont été réalisées qu'à partir de cultures (primaires et souvent de lignée) de cellules gliales. Ces études décrivent une multiplicité de fonctions, sans liens apparents, qui n'ont jamais pu être clairement vérifiées *in vivo*. L'apparition tardive des S100 dans l'évolution suggère un lien avec la complexification des fonctions des organes plus qu'un rôle majeur dans le développement ou la formation de ceux-ci. Des méthodes d'investigations plus précises à l'échelle cellulaire dans des conditions de stress particulier et utilisant des outils génétiques sont maintenant nécessaires pour pouvoir percevoir le(s) rôle(s) physiologique(s) de ces protéines encore mystérieuses.

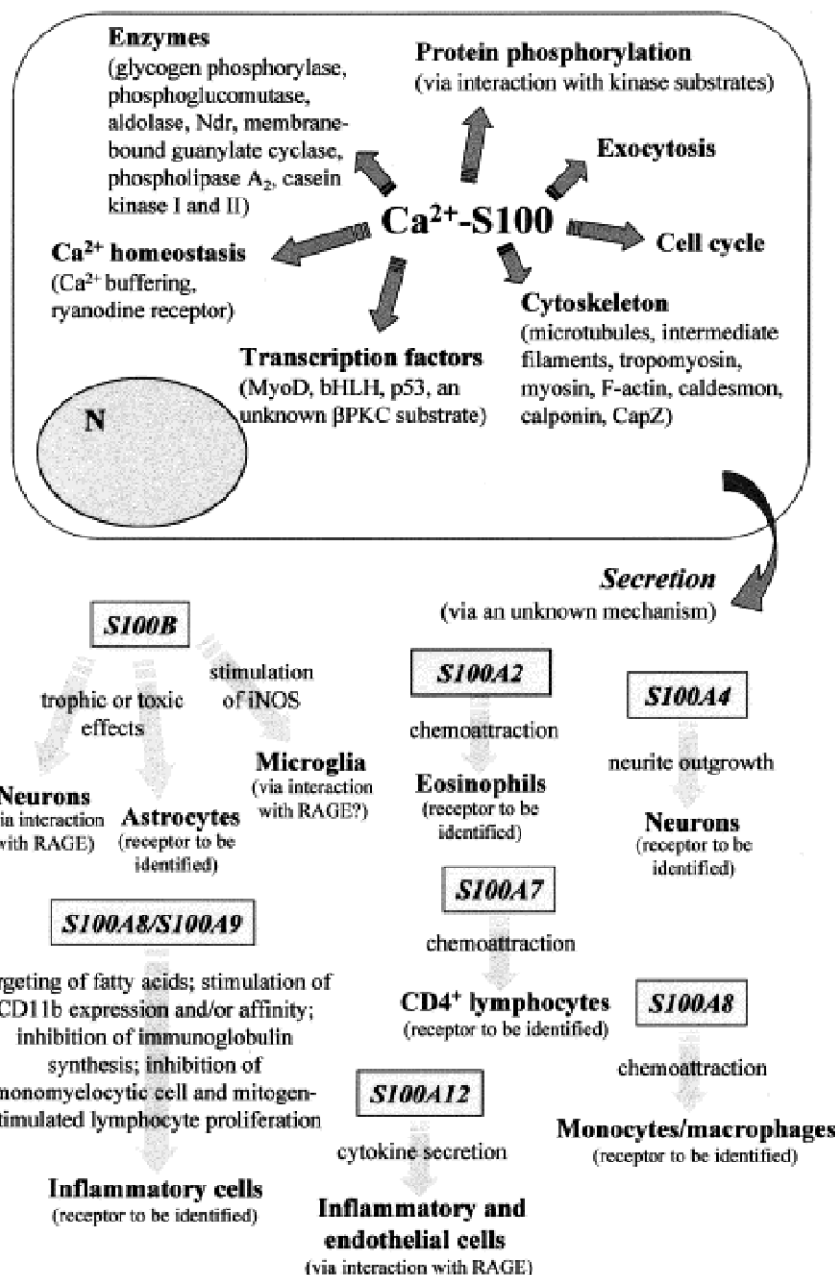


Figure 4: Représentation schématique des rôles intracellulaires et extracellulaires des protéines S100.

Les fonctions intracellulaires décrites ici ne sont pas toutes régulées de façon calcium dépendante (D'après Donato, 2001).

3 Le développement du lignage oligodendrocytaire

Les oligodendrocytes sont des cellules très arborisées, localisées le long des trajets axonaux dans le système nerveux central (SNC) et ont pour rôle d'augmenter l'efficacité de la conduction de l'influx nerveux en myélinisant les axones des neurones (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Au niveau du télencéphale, la formation des oligodendrocytes, ou oligodendrogenèse, se réalise par vagues successives. Une première très précoce, au cours du développement embryonnaire, puis une seconde juste après la naissance. Cependant dans les deux cas, le mécanisme général de maturation de ces oligodendrocytes reste inchangé.

Au cours de l'oligodendrogenèse, le précurseur oligodendrocytaire est la première cellule spécifique de ce lignage qui peut être observée. Dans les étapes précoces du développement, ces cellules précurseurs dérivent des cellules neuroépithéliales du tube neural. Elles émergent plusieurs jours (voire plusieurs semaines, chez l'homme) avant le début de la myélinisation (Hajihosseini et al., 1996; Rogister et al., 1999b). Les précurseurs donnent progressivement naissance aux progéniteurs, pro-oligodendrocytes, pré-oligodendrocytes et enfin aux oligodendrocytes matures myélinisants c'est à dire fonctionnels (Figure 5).

Le développement du lignage oligodendrocytaire a été essentiellement étudié chez les rongeurs (Miller et al., 1999). L'élaboration du lignage à partir du précurseur débute par une période d'intense prolifération suivie de la maturation qui prend fin lorsque les cellules atteignent le stade d'oligodendrocytes myélinisants. Ces phases de développement successives sont associées à une maturation cellulaire comprenant des modifications morphologiques, ainsi qu'une diminution progressive de leur taux de prolifération et de migration. Ces différentes phases se caractérisent aussi par une dépendance différentielle à des facteurs environnementaux de croissance et l'expression de diverses molécules de surface ou marqueurs (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Lubetzki, 1997; Miller, 1996; Miller et al., 1999). Parmi ces marqueurs, certains seront bien adaptés pour caractériser et suivre les différents stades de progression du lignage en cultures. Néanmoins, il sera beaucoup plus difficiles de les utiliser *in situ* du fait de leur expression dans d'autres types cellulaires *in vivo* (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). A l'inverse, d'autres seront spécifiques aux oligodendrocytes mais ne définiront pas un stade précis de développement de ces cellules (Deng and Poretz, 2003). Ces

marqueurs doivent être considérés comme des éléments modulaires qui en combinaison avec d'autres génèrent un patron unique (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

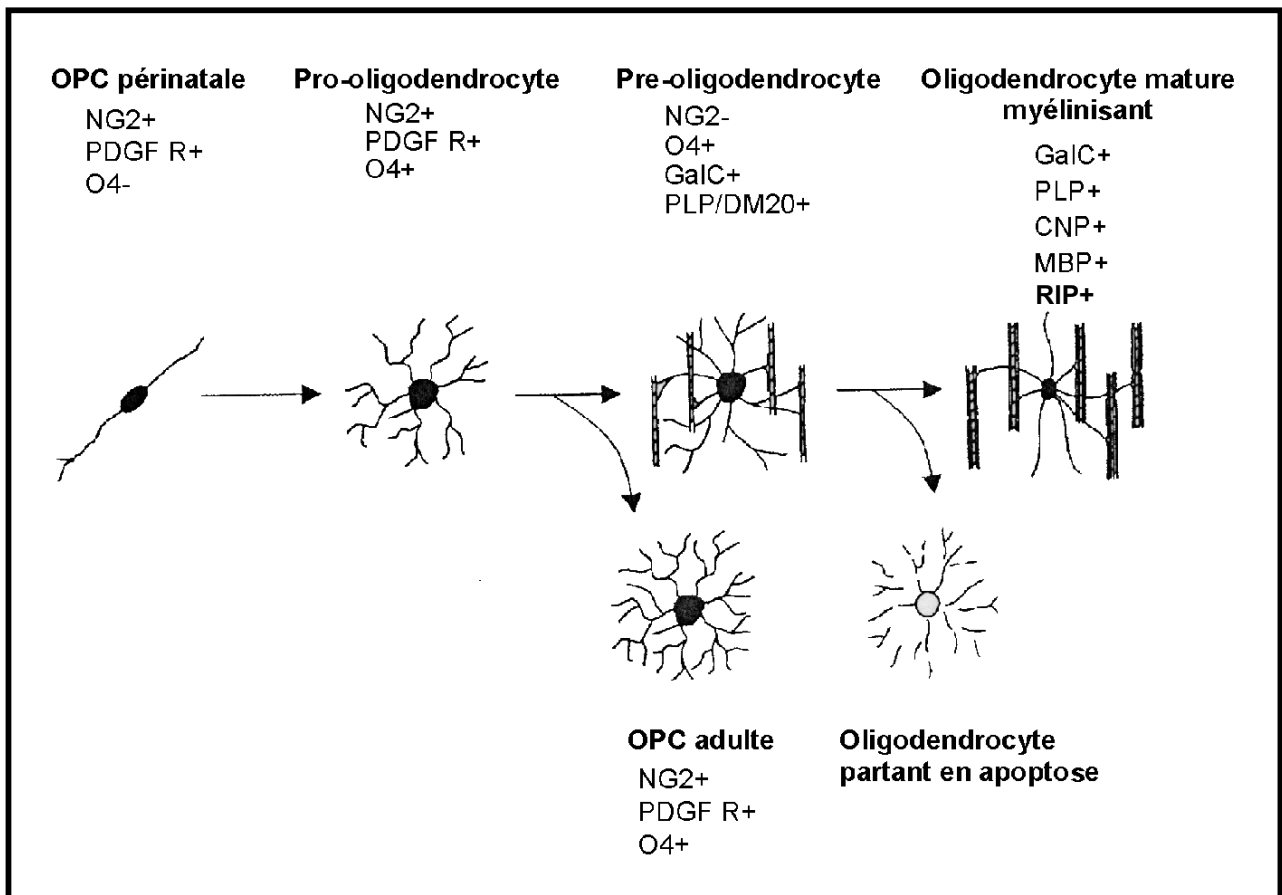


Figure 5: Stades de développement du lignage oligodendrocytaire (modifié d'après Dawson et al., 2000).

3.1 Du précurseur à l'oligodendrocyte mature

3.1.1 Le précurseur oligodendrocytaire

Dans les étapes précoces du développement, le précurseur d'oligodendrocytes est considéré comme une cellule neuroépithéliale qui se divise activement. Cette identification cellulaire tient au fait, qu'au cours du développement, les cellules neuroépithéliales étaient considérées comme étant les seules cellules pouvant générer des progéniteurs gliaux. Cependant, de nouvelles données démontrent que les cellules de la glie radiale pourraient, en fait, être ces précurseurs oligodendrocytaires. Cet aspect sera développé plus en détail dans la partie suivante (chapitre 4.3), ici le précurseur oligodendrocytaire sera considéré comme une cellule neuroépithéliale.

L'identification, *in vivo*, du précurseur oligodendrocytaire dans le temps et dans l'espace, est rendue difficile du fait de l'absence de marqueurs précoces qui soient spécifiques au lignage oligodendrocytaire et propres à cette étape. L'expression de la PSA-NCAM, forme polysialilée embryonnaire de la N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), définit le stade précurseur oligodendrocytaire, en absence de l'expression du ganglioside GD3 (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Ces précurseurs (puis les progéniteurs) sont également caractérisés par l'expression de la nestine, une protéine de filaments intermédiaires très proches des neurofilaments, qui distingue les cellules neuroépithéliales pluripotentes des cellules plus différenciées du tube neural (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). L'expression de la PSA-NCAM et de la nestine décline au cours de la maturation oligodendrocytaire mais aucune des deux n'est spécifique du lignage oligodendroglial (Deng and Poretz, 2003; Lubetzki, 1997). Les travaux de Richardson et collaborateurs ont initialement suggéré que l'expression du messenger du récepteur α au PDGF (*platelet-derived growth factor*), R α -PDGF, permettait de distinguer les précurseurs oligodendrocytaires des autres cellules neuroépithéliales et définirait ainsi des cellules très précoces du lignage dans la moelle épinière, chez le rat à 14 jours de développement embryonnaire (E14), la souris à E13 et le poulet à E7 (Pringle and Richardson, 1993; Pringle et al., 1996; Thomas et al., 2000; Woodruff et al., 2001). Ces auteurs ont ensuite montré, chez le rat, que les cellules positives pour le R α -PDGF isolées de cette région (à E17) ou du cerveau (à E19) par

immunosélection, se différencient toutes en oligodendrocytes dans des conditions de culture appropriées (Hall et al., 1996; Tekki-Kessarlis et al., 2001) et qu'inversement, la lyse médiée par le complément de ces cellules dans des cultures de moelle épinière aboutit à l'absence quasi-totale d'oligodendrocytes (Hall et al., 1996). Ces données indiqueraient que toutes les cellules $R\alpha$ -PDGF⁺ de la moelle épinière embryonnaire (de rat) appartiennent au lignage oligodendrocytaire et que la plupart des oligodendrocytes se développent à partir de ces cellules. Cependant, dans la mesure où des cellules supposées être des précurseurs neuronaux expriment aussi l'ARNm codant pour le $R\alpha$ -PDGF, ce marqueur n'est sans doute pas entièrement restreint, dans le SNC, au lignage oligodendrocytaire (Pringle and Richardson, 1993).

Une étude récente mentionne l'expression de la protéine $R\alpha$ -PDGF chez la souris, dès E8.5, dans les cellules neuroépithéliales de l'ébauche du tube neural et des neurones en cours de différenciation (Andrae et al., 2001). Le fait que l'expression du $R\alpha$ -PDGF soit difficile à détecter dans les neurones par hybridation *in situ* pourrait indiquer que les mécanismes de régulation de l'expression du gène *R α -PDGF* dépendent du type cellulaire (Andrae et al., 2001). L'équipe de Richardson a également observé l'expression de transcrits de CNP (*2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*), une enzyme de la myéline, dans la même région que celle des messagers *R α -PDGF* à E14 dans la moelle épinière de rat (Yu et al., 1994). Cet autre marqueur des précurseurs oligodendrocytaires n'est toutefois pas spécifique du lignage ; il est aussi détecté dans le SNP, la peau et, à E12, dans les neurones du SNC et leurs précurseurs (Yu et al., 1994). Un autre groupe de chercheurs a mis en évidence la présence de transcrits de l'isoforme DM20 de la PLP (*proteolipid protein*), la plus abondante des protéines de la myéline du SNC, dans des cellules neuroépithéliales de la moelle épinière de souris à E14,5 (Timsit et al., 1995). En outre, l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle des séquences régulatrices de *PLP* est restreinte aux cellules oligodendrogiales dans le SNC (Spassky et al., 1998). En plus de ces molécules de surface ou cytoplasmiques, des facteurs de transcription exprimés par les précurseurs oligodendrocytaires ont également été mis en évidence, cependant, aucun n'est spécifique à ce lignage.

Les facteurs de transcription à domaine bHLH (voir partie 4.4) Olig1 et Olig2 sont exprimés par les précurseurs oligodendrocytaires de la moelle épinière

embryonnaire de souris, un à deux jours avant les messagers $R\alpha$ -PDGF (Lu et al., 2000; Wegner, 2001; Woodruff et al., 2001; Zhou et al., 2000). Sox10, un autre facteur de transcription dont le domaine de liaison à l'ADN est une boîte HMG (*high mobility group*), commence à s'exprimer dans les précurseurs des oligodendrocytes au même moment que Olig2 (Wegner, 2001; Woodruff et al., 2001; Zhou et al., 2000). Olig1/2 et Sox10 sont donc considérés, à l'heure actuelle, comme les marqueurs les plus précoces du lignage oligodendrocytaire (Lu et al., 2000; Wegner, 2001; Woodruff et al., 2001; Zhou et al., 2000). Contrairement à celle du $R\alpha$ -PDGF, leur expression persiste au-delà de la période embryonnaire et est détectée dans les oligodendrocytes du SNC adulte des rongeurs (Lu et al., 2000; Marshall et al., 2005; Rowitch et al., 2002; Wegner, 2001; Woodruff et al., 2001).

3.1.2 Les cellules progénitrices d'oligodendrocytes

Au cours du développement embryonnaire, les précurseurs oligodendrocytaires migrent hors du neuroépithélium, tout en continuant à proliférer et à se différencier, pour aller, *in fine*, se positionner le long des axones qui seront myélinisés (c'est à dire dans la future substance blanche). La transition de cellules précurseurs à celui de cellules progénitrices d'oligodendrocytes, ou OPC (*Oligodendrocyte Precursor Cells*) s'opère dès que ces cellules quittent le neuroépithélium (Lubetzki, 1997; Thomas et al., 2000). Les OPC, embryonnaires et périnatales, possèdent des propriétés migratoires et prolifèrent activement durant leur migration (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Lubetzki, 1997). Ce sont des cellules bipolaires, qui ont conservés l'expression du $R\alpha$ -PDGF. Cependant, elles se distinguent des cellules précurseurs par l'expression de gangliosides tels que GD3 et ceux reconnus par l'anticorps A2B5, lesquels ne sont pas encore complètement caractérisés (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Lubetzki, 1997). Ces gangliosides disparaissent au cours du développement ultérieur des oligodendrocytes (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). Les anticorps anti-GD3 et A2B5 sont de bons marqueurs en culture mais reconnaissent d'autres types cellulaires dont des neurones *in vivo* (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). Les progéniteurs expriment également le protéoglycane à chondroïtine sulfate NG2 ou

AN2 pour la souris (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Diers-Fenger et al., 2001; Lubetzki, 1997).

Des OPC ont pu être isolés initialement à partir du nerf optique (Raff et al., 1983), puis à partir d'autres régions du SNC en développement, chez le rat nouveau-né telles la moelle épinière et le télencéphale (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Lee et al., 2000; Rogister et al., 1999a; Rogister et al., 1999b). L'isolement, *in vitro*, de ces cellules a permis de réaliser de nombreuses études notamment sur la caractérisation de leur propriétés de croissance et de différenciation (Rogister et al., 1999a; Rogister et al., 1999b). Les OPC sont des cellules bipotentes *in vitro*, qui ont la capacité de donner naissance à des oligodendrocytes de manière constitutive et à des astrocytes de type 2 en présence de sérum, ce qui leur a valu, dans un premier temps, l'abréviation de O-2A pour *oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor cells* (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Lee et al., 2000; Miller et al., 1999). Les potentialités de différenciation de ces cellules *in vivo* sont incertaines en absence d'évidence montrant l'existence d'astrocytes de type 2 *in situ* (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Lee et al., 2000; Miller et al., 1999). Cependant de récents travaux ont permis d'attribuer de nouvelles fonctions aux cellules NG2 périnatales (donc les OPC ?) en leur attribuant des propriétés de différenciation multiple *in vitro* et *in vivo* (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). Ainsi ces auteurs, utilisant une souris transgénique *cnp-EGFP*, ont pu montrer que celles-ci sont capable de générer des oligodendrocytes, des astrocytes et même des neurones (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). Ces résultats suggèrent donc un rôle et une plasticité plus large que celui de simples progéniteurs d'oligodendrocytes. Si ces résultats s'avèrent exacts, les perspectives thérapeutiques, notamment dans le cadre des scléroses en plaques, pourraient être considérable ; leurs implications dans l'apparition de certaines pathologies (oligodendrogliomes par exemple) sous-estimées.

Les cellules NG2⁺, bien que produites aux cours du développement, ont aussi été décrites chez l'adulte (Lee et al., 2000). Ces cellules NG2⁺ représentent la population majoritaire de cellules proliférantes du SNC adulte. Leur origine développementale n'est pas totalement connue, cependant elles sont généralement considérées comme étant des OPC périnatales ayant stoppé leur maturation oligodendrocytaire pour persister chez l'adulte (Figure 5, Dawson et al., 2000; Levine

et al., 1993; Shi et al., 1998). Ces cellules représenteraient un stock d'OPC assurant un renouvellement des oligodendrocytes soit de façon physiologique soit suite à une démyélinisation. Les OPC adultes diffèrent des OPC périnatales notamment parce qu'elles prolifèrent et se différencient beaucoup plus lentement (French-Constant and Raff, 1986; Wolswijk and Noble, 1989). De plus, contrairement à leurs homologues périnatales, les OPC adultes ont perdu une grande partie de leur plasticité cellulaire, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, des OPC adultes réimplantées dans le cerveau de souris shivrer ne peuvent se différencier qu'en oligodendrocytes là où des OPC périnatales peuvent se différencier en oligodendrocytes, en astrocytes voire en neurones (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003; Windrem et al., 2004).

D'autre part, de récents travaux suggèrent que toutes les cellules NG2⁺ adultes ne seraient pas des OPC, mais qu'une importante partie d'entre elles représenteraient une nouvelle population de cellules gliales matures, nommée "synantocytes" (Berry et al., 2002; Butt et al., 2002; Greenwood and Butt, 2003). Actuellement, la fonction exacte de ces cellules est inconnue. Néanmoins les propriétés de ces cellules commencent à être étudiées. Elles possèdent une morphologie étoilée, réalisent des contacts avec les axones au niveau des noeuds de Ranvier et ont une faible capacité à myéliniser (Berry et al., 2002). De plus, elles contrôlent les fonctions neuronales et réagissent suite à des lésions du SNC en aidant à la formation de la cicatrisation gliale (Butt et al., 2002). L'utilisation de la souris transgénique *cnp-EGFP*, a permis à Chittajallu et collaborateur (Chittajallu et al., 2004) de visualiser directement les cellules NG2⁺ afin d'étudier les propriétés membranaires de ces cellules. Les auteurs ont ainsi observé qu'une population de cellules NG2⁺ de la substance grise possède des profils d'expressions, suite à diverses stimulations de canaux ioniques, différents de ceux obtenus pour les cellules NG2⁺ de la substance blanche. Donc, au moins trois catégories de cellules NG2⁺ peuvent actuellement être distinguées : les OPC périnatales, les OPC adultes et les synantocytes. Le terme de "polydendrocytes" a été proposé afin de regrouper toutes les populations NG2⁺ (Nishiyama et al., 2002).

3.1.3 Le pro-oligodendrocyte et le pré-oligodendrocyte

La genèse du pro-oligodendrocyte a lieu au cours de la migration des progéniteurs le long des trajets axonaux. Cette cellule plus arborisée et moins mobile, garde la capacité à se diviser et, chez les rongeurs, acquiert l'immunoréactivité à l'anticorps O4. Au cours de cette maturation, le marquage NG2 diminue progressivement et le pré-oligodendrocyte n'exprimera finalement plus ce marqueur (Figure 5).

Le pré-oligodendrocyte est caractérisé par la perte de l'expression des antigènes GD3, A2B5 ou NG2 et l'apparition de GalC, lipide myélinique majoritaire, de CNP, la plus précoce des protéines spécifiques de la myéline à s'exprimer dans les oligodendrocytes et de PLP. Ce pré-oligodendrocyte, qui est richement arborisé, a perdu la capacité à se diviser et va ensuite subir deux étapes de maturation finale (Figure 5) (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Lubetzki, 1997; Miller, 2002; Miller et al., 1999).

3.1.4 L'oligodendrocyte mature myélinisant

La première étape consiste en la synthèse des protéines myéliniques MBP (*myelin basic protein*), RIP ou MAG (*myelin-associated glycoprotein*). Elle débute juste avant la capacité à élaborer la myéline et désigne les oligodendrocytes, au sens large du terme. L'apparition de ces composés se fait de façon séquentielle *in vitro* comme *in vivo*, au cours du développement. Ces cellules se distinguent aussi des pré-oligodendrocytes par leur morphologie plus complexe. Les oligodendrocytes vont ensuite subir une dernière étape de maturation afin de devenir des oligodendrocytes matures myélinisants (Figure 5). Elle se caractérise par une expression de MOG (*myelin/oligodendrocyte glycoprotein*), une protéine spécifique de la myéline du SNC uniquement présente chez les mammifères, et signe la fin de la maturation oligodendrogliale et l'engagement de la cellule dans la myélinisation des axones. C'est uniquement à partir de ce stade que l'oligodendrocyte est dit mature myélinisant c'est à dire fonctionnel. (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Lubetzki, 1997).

3.2 Les facteurs de régulation extrinsèques

La myélinisation des axones sur toute leur longueur nécessite que le nombre d'oligodendrocytes généré soit exactement adapté au nombre d'axones à myéliniser (Miller, 2002). Le nombre d'oligodendrocytes dans une région donnée du SNC dépend de la quantité de progéniteurs qui atteignent cette région, de la capacité de prolifération des cellules oligodendrogiales avant de se différencier et de la mort cellulaire (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). Le comportement des différents types de cellules oligodendrogiales élaborés au cours du développement du lignage est influencé par divers facteurs qui, seuls ou en combinaison, régulent leur prolifération, survie, migration et différenciation (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Dubois-Dalcq and Murray, 2000). La plupart des données concernant la régulation du développement des oligodendrocytes proviennent d'études réalisées *in vitro*. Parmi les facteurs de croissance impliqués dans ces événements, le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), tous deux produits par les neurones et les astrocytes, sont les mieux caractérisés. Le PDGF est un puissant mitogène pour les progéniteurs oligodendrocytaires (qui expriment le R α -PDGF), il favorise également leur migration et leur survie. Ces effets ont premièrement été montrés grâce à des études *in vitro*, puis confirmés *in vivo* (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Miller, 2002; Orentas et al., 1999). L'invalidation du gène codant pour le PDGF-A chez la souris aboutit à une réduction sévère du nombre de progéniteurs et d'oligodendrocytes dans la moelle épinière (Fruttiger et al., 1999). Le résultat inverse est obtenu lorsque ce gène est surexprimé dans les neurones (Calver et al., 1998).

Les cellules progénitrices prolifèrent également en réponse au bFGF (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Miller, 2002; Miller et al., 1999; Orentas et al., 1999). Ce facteur augmente aussi la migration des progéniteurs *in vitro*, ce qui est confirmé par le fait que des progéniteurs exprimant un récepteur dominant négatif au FGF et transplantés *in vivo* ne sont pas capables de migrer (Dubois-Dalcq and Murray, 2000). Par la suite, les pro-oligodendrocytes vont perdre leur réponse proliférative au PDGF mais continueront à se multiplier en présence de bFGF, lequel bloque ainsi leur maturation. Finalement, les

oligodendrocytes différenciés ne seront plus sensibles ni aux effets mitogènes du PDGF ni à ceux du bFGF.

La combinaison du PDGF et du bFGF maintient les cellules au stade d'OPC et permet une prolifération cellulaire à long terme sans sénescence *in vitro* (Kondo T and Raff M., 2000). De façon intéressante, les pro-oligodendrocytes cultivés en présence de PDGF et de bFGF sont capables de redevenir des progéniteurs (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Miller, 2002; Miller et al., 1999; Orentas et al., 1999). De plus, les Dr. Kondo T. et Raff M. ont récemment observé que ces OPC traitées peuvent ensuite être reprogrammées pour redevenir des cellules souches neurales. Cependant, cette multipotentialité nécessite un traitement avec la protéine diffusible BMP (*Bone Morphogenic Protein*) afin d'induire un état intermédiaire astrocytaire avant de produire des neurones (Kondo T and Raff M., 2000). Inversement, le retrait de ces facteurs de croissance permet la maturation des OPC en oligodendrocytes. Il est probable que le bFGF allonge la période développementale pendant laquelle les cellules oligodendrogiales sont capables de répondre au PDGF puisqu'il augmente l'expression du $R\alpha$ -PDGF (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Miller, 2002; Miller et al., 1999; Orentas et al., 1999).

Au cours de leur progression dans le développement du lignage, les cellules oligodendrogiales présentent des réponses variées au bFGF, vraisemblablement en conséquence de la régulation différentielle de l'expression des transcrits des récepteurs de haute affinité pour ce facteur, FGFR1 à 3 (*FGF receptor-1 to 3*) durant ce processus. L'expression des messagers de FGFR1 augmente au fur et à mesure de la progression dans le lignage, les ARNm de FGFR2 sont présents de manière prédominante dans les oligodendrocytes différenciés alors que ceux de FGFR3 atteignent un pic d'expression dans les pro-oligodendrocytes (Bansal et al., 1996; Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Miller, 2002; Miller et al., 1999; Orentas et al., 1999).

L'hormone thyroïdienne T3 (3,3',5-triiodothyronine) est essentielle pour l'oligodendrogenèse et la myélinogenèse ; elle exerce des effets pléiotropiques sur le lignage oligodendrocytaire et agit à plusieurs stades du développement de ces cellules (Deng and Poretz, 2003; Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Rogister et al., 1999a; Rogister et al., 1999b). Elle augmente d'une part, la prolifération des précurseurs et d'autre part, la maturation des oligodendrocytes immatures post-

mitotiques en stimulant l'expression de gènes de la myéline (Deng and Poretz, 2003). Ces actions distinctes sont réalisées par différentes isoformes de récepteurs, qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et qui sont exprimées différemment durant l'oligodendrogenèse (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003; Dubois-Dalcq and Murray, 2000). Le récepteur α à l'hormone thyroïdienne, $THR\alpha$ (*thyroid hormone receptor α*) est présent dans les OPC puis son expression diminue au moment de la différenciation terminale des oligodendrocytes, ce qui suggère que cette isoforme est plutôt responsable des effets sur la prolifération (Deng and Poretz, 2003). A l'inverse, le $THR\beta$ (*thyroid hormone receptor β*) qui est fortement exprimé dans les cellules matures serait associé à la formation des oligodendrocytes fonctionnels et myélinisants (Deng and Poretz, 2003). A l'appui de cette possibilité, le promoteur des gènes *MBP* et *PLP*, codant les protéines majoritaires de la myéline, présente des éléments de réponse pour le $THR\beta$ (Dubois-Dalcq and Murray, 2000).

Comme le PDGF, le GGF (*glial growth factor*), une neuréguline qui a un rôle démontré dans la prolifération et la survie des cellules de Schwann, l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) et la NT3 (*neurotrophine 3*) exercent à la fois des effets mitogènes et anti-apoptotiques sur les cellules oligodendrogiales (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Lubetzki, 1997). L'IGF-1, le CNTF et la NT3 ont des effets mitogènes s'ils agissent en combinaison avec d'autres facteurs mitogènes dont le PDGF (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Dubois-Dalcq and Murray, 2000; Miller et al., 1999). Le LIF (*leukemia inhibitory factor*) et l'IL-6 (*interleukine-6*), deux cytokines apparentées au CNTF, sont des facteurs de survie pour les cellules oligodendrocytaires, sans effet sur leur prolifération (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Lubetzki, 1997).

L'oligodendrogliose possède une variété de récepteurs/canaux ioniques pour des neurotransmetteurs, dépendant du ligand et du voltage et dont les niveaux d'expression diffèrent d'un stade de l'oligodendrogenèse à un autre (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). Le glutamate fait partie des neurotransmetteurs impliqués dans la formation des oligodendrocytes les mieux caractérisés (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and Poretz, 2003). Il intervient notamment dans la régulation de la prolifération et de la maturation oligodendrocytaire; c'est un facteur antimitotique pour les précurseurs et progéniteurs dans des cultures de coupes de cervelet (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Deng and

Poretz, 2003; Dubois-Dalcq and Murray, 2000). Le récepteur D3 à la dopamine est exprimé tôt au cours du développement du lignage et absent de la surface des oligodendrocytes matures. Il est impliqué dans la modulation temporelle de la maturation de ces cellules et de l'élaboration de la myéline (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Le récepteur μ aux opioïdes est présent dans les cellules oligodendrogiales précoces et sa stimulation entraîne une réponse proliférative. Le récepteur κ est détecté plus tard, au moment de l'expression de MBP (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

3.3 Origine des oligodendrocytes de la moelle épinière

Jusqu'à récemment, l'OPC était considéré comme la cellule aux potentialités oligodendrogéniques la plus précoce que l'on puisse directement isoler du SNC. Cependant, une nouvelle population de cellules A2B5⁺, restreintes à la genèse de cellules macrogliales, a été identifiée dans la moelle épinière du rat, plus tôt au cours du développement -i. e. à E13,5 (Figure 6). Ces cellules appelées GRP (pour *glial restricted precursor cells*) se distinguent des OPC par trois propriétés (Lee et al., 2000): 1) elles n'expriment pas le R α -PDGF (Rao et al., 1998) 2) elles sont tripotentes, *in vitro*, pouvant générer des oligodendrocytes et deux types d'astrocytes (Rao et al., 1998) 3) elles sont capables de se différencier en oligodendrocytes et en astrocytes *in vivo*, après transplantation dans le cerveau nouveau-né ou adulte (Herrera et al., 2001).

Une étude récente montre que ces GRP peuvent aussi donner naissance à des cellules, elles-mêmes bipotentes *in vitro*, qui possèdent les caractéristiques antigéniques et de différenciation des OPC (Gregori et al., 2002). Les auteurs proposent le modèle selon lequel le lignage oligodendrocytaire se développe à partir de cellules neuroépithéliales pluripotentes qui passent par les stades GRP (tripotent), puis OPC (bipotent) avec une restriction concomitante des potentialités de développement (Gregori et al., 2002) (Figure 6).

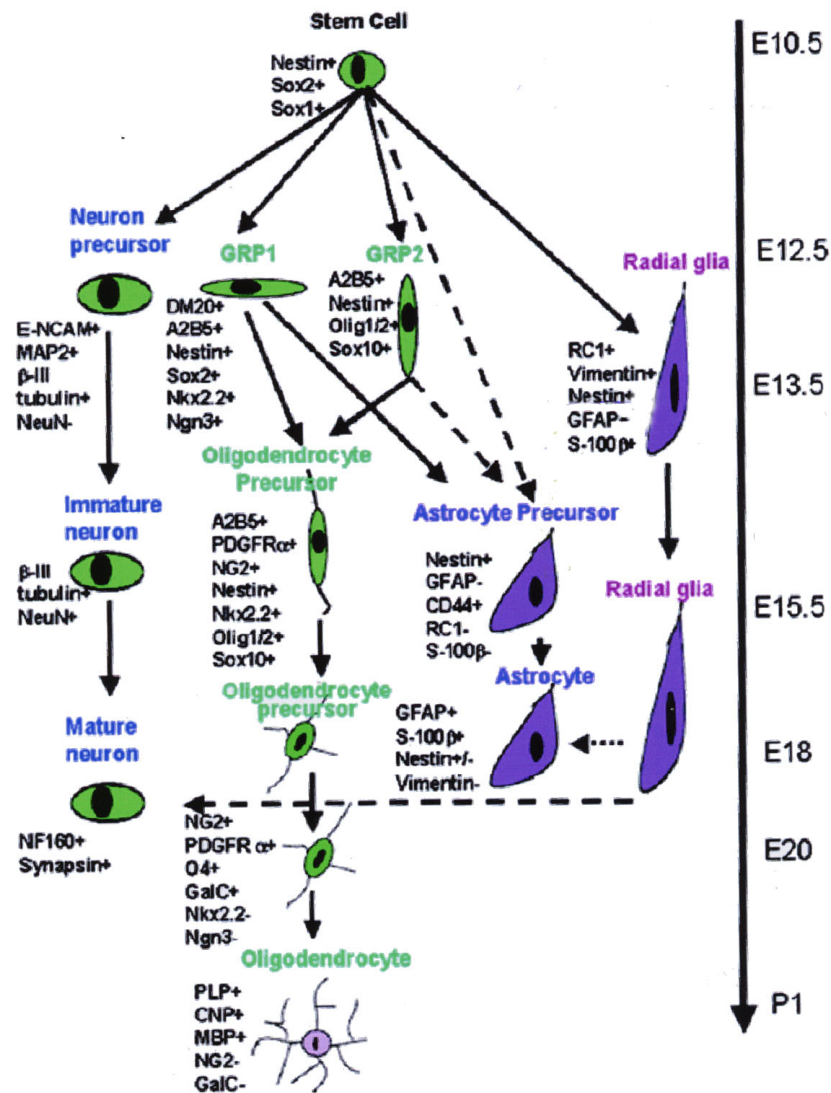


Figure 6: Les oligodendrocytes de la moelle épinière pourraient aussi provenir d'un précurseur glial restreint, ou GRP.

Dans ce modèle, les GRP (1 ou 2) proviendraient d'une cellule souche. Ils génèreraient ensuite des précurseurs d'oligodendrocytes et/ou d'astrocytes. Ceux-ci se développeraient par la suite selon les voies de maturation classique (D'après Liu et al., 2004).

Ces études, démontrant l'existence *in vitro* de progéniteurs gliaux restreints, suggèrent l'existence de progéniteurs d'oligodendrocytes et d'astrocytes dans les régions ventrales mais aussi dorsales de la moelle épinière. Ces observations sont assez troublantes puisque l'origine des oligodendrocytes au niveau de la moelle est considérée comme exclusivement ventrale. En effet, la moelle spinale est composée d'une région dorsale et ventrale. Le neuroépithélium ventral peut être sub-divisé en cinq domaines (P0-P5 et le domaine pMN, Figure 7). Chacun de ces domaines exprime des combinaisons particulières de facteurs de transcription afin de produire des catégories neuronales précises suivies par des vagues d'astrogliogenèse ou d'oligodendrogenèse (Rowitch, 2004). Le domaine pMN exprime les facteurs de transcription *Nkx6* et *Olig1/2* (Mizuguchi et al., 2001; Novitsch et al., 2001), il est considéré comme étant à l'origine de la production de moto-neurones puis de tous les OPC de la moelle (Richardson et al., 1997; Fu et al., 2002). En outre, la partie ventrale est sujette à l'influence de *Shh* alors que la partie dorsale est soumise au facteur diffusible BMP. Ceci accentue l'idée d'une origine oligodendrogenique ventrale et d'une région dorsale dédiée à l'astrogliogenèse (Rowitch, 2004, Figure 7).

Récemment, deux nouvelles études ont cependant démontré une deuxième vague d'oligodendrogenèse au niveau de la moelle épinière. Celle-ci est plus tardive et provient de la région dorsale (Cai et al., 2005 ; Vallstedt et al., 2005). Utilisant des mutants pour les facteurs de transcriptions *Nkx6.1* et *Nkx6.2* ou pour le facteur *Shh* couplés à des cultures d'explants, ils ont démontré que contrairement à la région ventrale, cette oligodendrogenèse dorsale est *Shh* indépendante et est régulée par le taux de BMP. Ces expériences démontrent de multiples origines et mécanismes de régulation pour la génération d'oligodendrocytes au niveau de la moelle épinière.

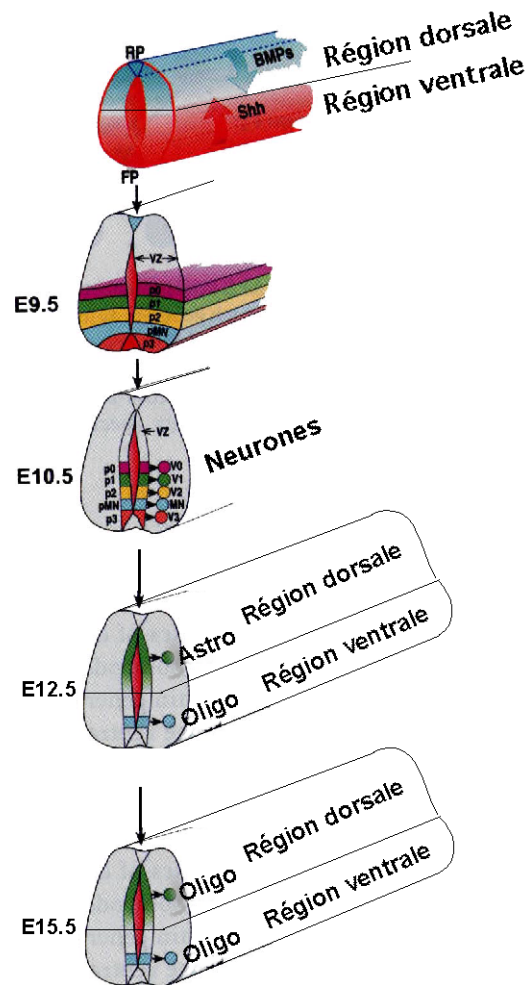


Figure 7 : Les oligodendrocytes de la moelle épinière sont produit séquentiellement dans la région ventrale puis dorsale.

Au début du développement embryonnaire, la région dorsale est sous l'influence du facteur BMP alors que la partie ventrale est sous celle de Shh. Vers E9.5-E10.5, une neurogenèse se produit dans la région ventrale. Vers E12.5, le domaine ventral pMN arrête de générer des motoneurones et produits des OPC. Vers E15.5, le taux de BMP dorsal diminue et une oligodendrogenèse dorsale plus tardive et Shh indépendante peut aussi se dérouler. (Dessin modifié d'après Anderson., 2001).

3.4 Origine des oligodendrocytes du télencéphale

Si le développement des cellules engagées dans la voie oligodendrocytaire est relativement bien connu, l'origine des oligodendrocytes du télencéphale commence seulement à être élucidée. Ces études récentes ont ainsi permis de démontrer des similarités dans le développement d'oligodendrocytes provenant du télencéphale ou de la moelle épinière.

En effet, des travaux en 2001 décrivent une origine ventrale des oligodendrocytes du télencéphale au cours du développement embryonnaire. Cette région ventrale est nommée région entopédonculaire antérieure, ou AEP (Olivier et al., 2001; Spassky et al., 1998). Les OPC seraient de ce fait, issus de précurseurs neuroépithéliaux ventraux comme dans la moelle épinière. La première évidence expérimentale, provient d'études réalisées à partir de culture cellulaires. Avant la naissance (E15), les progéniteurs isolés du télencéphale ventral (futur striatum) ont une plus grande capacité à générer des oligodendrocytes, *in vitro*, que ceux obtenus à partir du cortex cérébral (partie dorsale). A l'inverse, si ces études sont réalisées après la naissance, les progéniteurs dorsaux sont alors capable de générer de très nombreux oligodendrocytes (Birling and Price, 1998; Tekki-Kessarlis et al., 2001). L'interprétation de ces résultats est que, dans le télencéphale comme dans la moelle épinière, les OPCs provenant des régions ventrales du neuroépithélium vont migrer au cours du développement embryonnaire vers les régions dorsales suivant un gradient dorso-ventral de Shh (*Sonic Hedgehog*). Les travaux du groupe de Richardson supportent cette hypothèse en démontrant que la signalisation Shh est directement responsable de l'oligodendrogenèse dans le télencéphale. Tout d'abord, l'ARN messager codant pour Shh s'exprime dans la région ventriculaire de l'AEP au cours de l'oligodendrogenèse (Tekki-Kessarlis et al., 2001). Ensuite l'expression de Shh est nécessaire pour une spécification oligodendrocytaire dans le télencéphale. Ainsi, la perte de l'expression de Shh dans le télencéphale ventral, chez des mutants pour le facteur de transcription *Nkx2.1*, entraîne une perte d'expression du α -PDGF dans tout le télencéphale (Nery et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001). Enfin, l'expression de Shh est suffisante pour induire la formation d'oligodendrocytes *in vitro* et *in vivo*. Nery et collaborateurs, ont ainsi démontré que la surexpression de Shh induit une formation ectopique d'oligodendrocytes *in vivo* et restaure partiellement le développement oligodendrocytaire chez les mutants *Nkx2.1* (Nery et al., 2001).

L'interprétation d'une origine ventrale des OPC du télencéphale repose aussi sur des études démontrant l'existence d'un gradient de la protéine DM-20, une forme épissée de la protéine protéolipide de la myéline, ainsi que du R α -PDGF, à partir de l'AEP vers les régions dorsales (Pringle and Richardson, 1993; Pringle et al., 1996; Spassky et al., 1998; Spassky et al., 2001; Tekki-Kessarlis et al., 2001). De plus différentes approches expérimentales utilisant des chimères caille/poulet ou poulet/souris ont ensuite démontré que les OPCs précoces du télencéphale pouvaient provenir, au moins en partie, de cette AEP (Olivier et al., 2001). En outre, après l'apparition de cellules exprimant le R α -PDGF dans les régions ventrales, celles-ci vont augmenter en nombre pour ensuite commencer à se disperser dans tout le télencéphale. Ces observations suivent parfaitement celles obtenues avec d'autres marqueurs d'OPC, tel NG2 (Dawson et al., 2000; Levine and Stallcup, 1987; Stallcup and Beasley, 1987). Enfin, il a été clairement établi que les OPC sont tout à fait capables de migrer sur de longues distances (plusieurs millimètres) au cours du développement embryonnaire (Ono et al., 1995). Cependant, très peu de données permettent d'expliquer la seconde vague post-natale d'oligodendrogenèse se déroulant dans la zone sous ventriculaire (SVZ). Après la naissance, des progéniteurs gliaux émigrent de la SVZ vers le striatum, la substance blanche ainsi que dans les diverses régions du cortex où ils se différencient, notamment, en oligodendrocytes (Levison et al., 1993; Levison and Goldman, 1993; Luskin and McDermott, 1994; Parnavelas, 1999). L'origine même de ces progéniteurs gliaux de la SVZ post-natale n'est pas encore clairement établie, toutefois des données récentes suggèrent une participation des cellules de la glie radiale dans l'oligodendrogenèse et/ou dans la formation de cellules progénitrices (voir partie 4.3 et figure 11).

En conclusion, si toutes ces observations élargissent nos connaissances sur l'origine embryonnaire des oligodendrocytes du télencéphale et les mécanismes généraux de leur développement, elles ne permettent pas l'identification d'acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la maturation des OPC en oligodendrocytes, soit au cours du développement soit chez l'adulte. Des modèles animaux de démyélinisations associés à des animaux invalidés pour un gène candidat doivent être réalisés afin de mieux comprendre les événements contrôlant la maturation d'un OPC en oligodendrocyte.

4 Les cellules souches neurales du système nerveux central adulte

4.1 Introduction

La compréhension des étapes développementales conduisant à la formation du système nerveux central (SNC) a toujours été au centre de nombreuses recherches en neurobiologie. Ces études ont d'ailleurs commencé très tôt, dès les années 1850, et ont fournis de précieux éléments dans la description morphologique des types cellulaires présents au cours du développement du cerveau. Cependant, l'interprétation issue de ces observations a conduit à l'élaboration de dogmes qui ont perduré pendant près d'un siècle. Ainsi Wilhem His, dans les années 1850, rechercha l'origine embryonnaire des cellules neuronales et gliales en examinant la région de l'épithélium neural. Il décrivit des cellules mitotiques rondes, près de la lumière du tube neural, comme étant des précurseurs neuronaux, alors que les autres cellules possédant une morphologie plus allongée, nommées spongioblastes puis glie radiale, furent considérées comme produisant exclusivement des cellules gliales. A partir de ses observations, Wilhem His conclut logiquement que les neurones et la glie étaient produits par deux populations distinctes de cellules progénitrices. Une hypothèse dominante va alors émerger, suggérant que des précurseurs différents et prédéterminés, au niveau du tube neural précoce, produisent soit des neurones soit de la glie ségrégeant précocément le lignage neuronal et glial au cours du développement (Figure 8).

Associé à l'idée d'une origine séparée entre les neurones et la glie, un autre dogme s'est progressivement installé en neurobiologie développementale : la génération de nouveaux neurones, ou neurogenèse, n'a lieu que pendant le développement embryonnaire et périnatal. Cette conception a notamment été soutenue par le fait que 1) les petites cellules rondes, décrites comme étant les progéniteurs neuronaux, disparaissent massivement après la naissance 2) un faible nombre de cellules prolifèrent dans le SNC adulte 3) aucun neurone n'a jamais été observé en train de proliférer chez l'adulte 4) il n'y a pas de régénérations neuronales après une lésion cérébrale, chez les mammifères. En outre, les zones germinales responsables de la neurogenèse embryonnaire, sont drastiquement

rétrécies après la naissance conduisant à l'hypothèse que ces centres germinatifs deviennent vestigial après la naissance.

Le concept qu'aucune neurogenèse ne peut se dérouler chez l'adulte, a été controversé tout d'abord dans les années 1960, quand Joseph Altman a proposé que de nouvelles cellules nerveuses pourraient être produites dans certaines régions restreintes du cerveau adulte (Altman, 1962; Altman, 1963; Altman, 1966; Altman and Das, 1965). Malheureusement, ces observations étaient principalement basées sur des analyses, en microscopie optique, de cellules radio-marquées à la thymidine tritiée. De ce fait, la nature neuronale de ces cellules n'a pas pu être clairement établie. C'est pourquoi, faute de preuves suffisantes et de techniques d'investigations plus précises, l'idée d'une neurogenèse adulte sera abandonnée pendant près de vingt ans. Ce sont les travaux du laboratoire de Nottebohm qui démontrèrent indiscutablement, l'existence d'un renouvellement neuronal dans le télencéphale adulte des canaries (Burd and Nottebohm, 1985; Goldman and Nottebohm, 1983). Cependant cette découverte, confirmée par des travaux chez le lézard ou les poissons (Garcia-Verdugo et al., 2002; Lopez-Garcia et al., 1988; Lopez-Garcia et al., 1992; Lopez-Garcia et al., 1984), sera négligée par les neurobiologistes travaillant chez les mammifères ; l'idée d'une neurogenèse adulte n'était toujours pas rentrée dans les mœurs.

Quelques années plus tard, dans les années 1990, l'existence de cellules souches adultes, va être clairement démontrée chez les mammifères. Cette découverte va être le premier élément à l'origine d'un bouleversement des conceptions neurobiologiques et développementales.

En effet, lorsque des cellules du striatum adulte ont été mises, *in vitro*, en présence des facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) et bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), une petite population cellulaire a été capable de se multiplier et de former des regroupements cellulaires flottant, qui furent nommés "*neurosphères*" (Reynolds et al., 1992). Ces neurosphères avaient une capacité extraordinaire et inattendue : celle de générer, *in vitro*, les trois catégories cellulaires principales constituant le SNC, que sont les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. En outre, lorsque les neurosphères étaient dissociées et que les cellules étaient placées individuellement dans des conditions de culture non adhérentes en présence des facteurs de croissance pré-cités, une sous population était encore capable de redonner des neurosphères secondaires et multipotentes. Puisque l'auto-

renouvellement et la différenciation multiple sont les critères de base pour décrire une cellule souche, ces études indiquaient que certaines d'entre elles étaient retenues dans le cerveau adulte.

Dans le même temps, différentes études ont démontré que de nouveaux neurones continuaient à être produits dans deux régions particulières du télencéphale de mammifères adultes : la zone sous ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996) et la zone sous granulaire (SGL) du gyrus denté de l'hippocampe (Cameron et al., 1993; Gage et al., 1998; Kaplan and Bell, 1984; Palmer et al., 1997). Cette découverte sera le deuxième élément majeur en neurobiologie permettant aux scientifiques de concevoir qu'une neurogenèse puisse aussi avoir lieu chez les mammifères adultes.

La découverte quasi simultanée de cellules souches et de zones de neurogenèse chez l'adulte va ensuite conduire à une caractérisation précise de ces zones ainsi qu'à l'identification des cellules souches adultes. Les découvertes qui seront réalisées détruiront non seulement le dogme d'une absence de neurogenèse adulte, mais modifieront complètement notre conception de l'origine développementale des neurones et des cellules gliales.

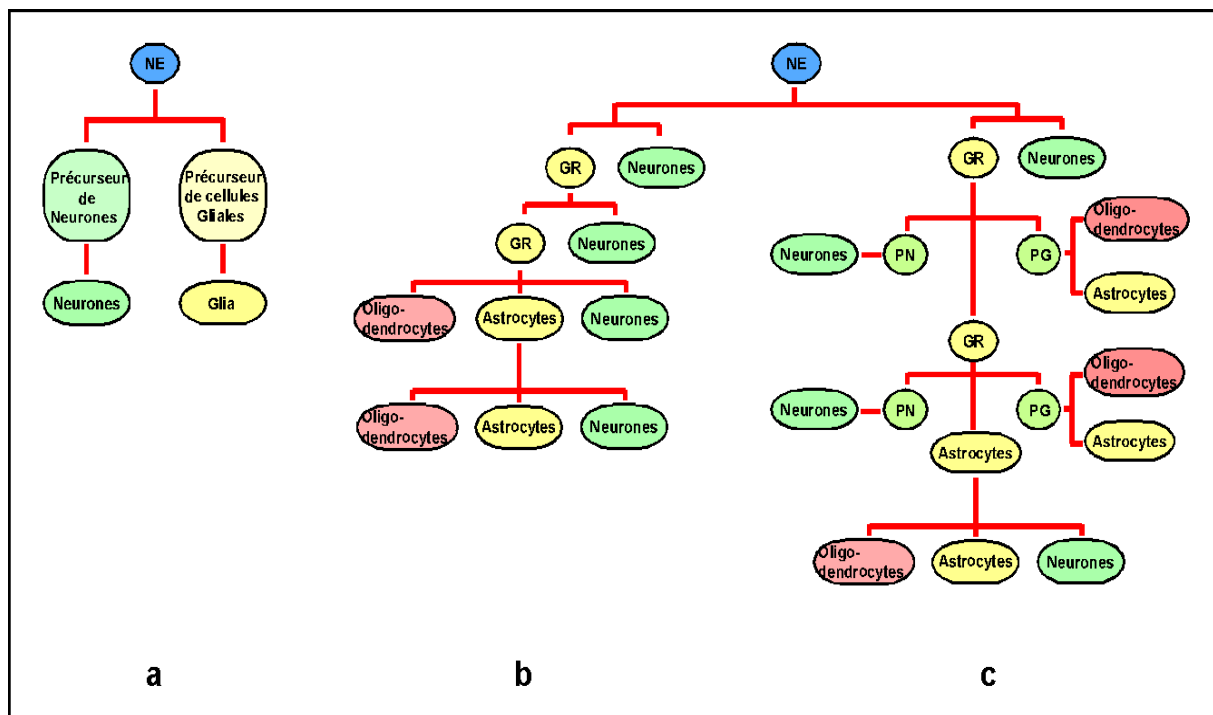


Figure 8: Evolution des modèles représentant le lignage des cellules neurales du SNC au cours du développement embryonnaire.

a- Historiquement, il était considéré que les cellules neuroépithéliales (NE) du tube neural produisait deux groupes de progéniteurs neuronaux et gliaux distincts. **b-** De nouvelles données, proposent un autre modèle où les cellules NE peuvent se transformer en glie radiale (GR). Au cours de la neurogenèse, La GR peut se diviser de façon asymétrique pour produire un neurone post-mitotique. Pendant la gliogenèse, la GR génère aussi des astrocytes et des oligodendrocytes. Au niveau de la zone sous ventriculaire adulte, la GR évolue directement en astrocytes germinatifs multipotents. **c-** Des dernières observations montrent que la production de cellules neuronales ou gliales à partir de la GR ou d'astrocytes germinatifs peut aussi passer par un progéniteur neuronal (PN) ou glial (PG) transitoire.

4.2 La neurogenèse chez les mammifères adultes

Chez les mammifères, l'étude de la neurogenèse adulte a été longtemps controversée. Après plusieurs années de débats sur l'identité des cellules proliférantes du SNC adulte, il est maintenant clairement établi qu'une neurogenèse persiste dans deux régions du télencéphale adulte : la zone sous ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral et la zone sous granulaire (SGL) du gyrus denté de l'hippocampe.

4.2.1 La zone sous ventriculaire adulte

La SVZ est une région germinale spécialisée au niveau du ventricule latéral produisant de nouveaux progéniteurs de neurones, ou neuroblastes, destinés au bulbe olfactif (Doetsch, 2003a). Ces neuroblastes doivent ensuite migrer sur une longue distance (3-8mm chez la souris) afin d'atteindre le site final de différenciation en neurones glomérulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif.

La présence d'un grand nombre de cellules proliférantes au niveau de la SVZ est connue depuis plus d'une centaine d'année déjà (Allen, 1912). Cette zone de prolifération est présente chez de nombreux vertébrés tels que la souris, le rat, le lapin, le hamster, le chien, le singe et l'être humain (Garcia-Verdugo et al., 2002). La destinée des cellules proliférantes de la SVZ a longtemps été sujet à controverse. Alors que des travaux réalisés par Joseph Altman, suggéraient un devenir neuronal (Altman, 1969; Altman and Das, 1970), d'autres études s'accordaient à attribuer un rôle unique de réservoir pour des cellules précurseurs de cellules gliales (Messier et al., 1958; Privat, 1977; Privat and Leblond, 1972). Comme nous le verrons plus loin, ces deux hypothèses étaient vraies. D'autres études ont aussi proposé que les cellules proliférantes n'étaient pas utilisées et mourraient après leur mitose (Messier et al., 1958; Morshead and van der Kooy, 1992).

La démonstration directe qu'une grande partie de ces cellules étaient des précurseurs neuronaux, a finalement été obtenue par l'équipe d'Alvarez-Buylla, après la mise en culture des cellules de la SVZ préalablement marquées, *in vivo*, à la thymidine tritiée (Lois and Alvarez-Buylla, 1993). Ensuite, cette même équipe a pu suivre, *in vivo*, le devenir de ces cellules marquées. *In vivo*, les cellules proliférantes

de la SVZ génèrent de nouveaux précurseurs de neurones qui vont ensuite migrer jusqu'au bulbe olfactif le long d'une voie de migration appelée RMS (*Rostral Migratory Stream*) pour sy différencier en interneurone olfactif (Figure 9). Ces neurones néosynthétisés vont alors permettre le renouvellement d'interneurones olfactifs (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Ainsi, l'existence d'une neurogenèse adulte chez les mammifères a pu être clairement démontrée. De plus, ces résultats suggèrent que des cellules souches neurales sont probablement maintenues dans la SVZ adulte afin d'assurer la production quotidienne de neuroblastes.

Au même moment, des études *in vitro* vont venir compléter ces résultats. Des cellules possédant des propriétés de cellules souches neurales (auto-renouvellement et multipotence) ont pu être isolées à partir de SVZ adultes en cultivant les cellules extraites en présence de facteurs de croissance tels que l'EGF, le bFGF ou les deux (Gritti et al., 1999; Morshead and van der Kooy, 1992; Rietze et al., 2001). De façon intéressante, des cellules souches neurales peuvent aussi être isolées d'autres régions du cerveau, mais seule celles issues de la SVZ peuvent croître en présence d'EGF seul (Reynolds and Weiss, 1996).

Afin d'identifier les cellules souches neurales, la composition ainsi que l'organisation cellulaire de la SVZ ont été étudiées (Figure 9, Doetsch et al., 1997). La SVZ est physiquement séparée du ventricule par une monocouche de cellules épendymaires multiciliées. Au sein de cette SVZ, les neuroblastes (appelés type A) migrent en formant des chaînes (Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). Ces chaînes se retrouvent le long d'un réseau de voies de migrations distribué tout au long du mur ventriculaire (Figure 9). Ensuite, les neuroblastes de type A se regroupent au niveau antérieur et dorsal de la SVZ pour quitter cette SVZ en formant une seule voie particulière nommée RMS. La RMS ou voie de migration rostrale, permet ainsi aux cellules de type A de rejoindre le bulbe olfactif où elles se différencieront en neurones granulaires et périglomérulaires (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Ces chaînes de neuroblastes (dans la SVZ comme dans la RMS) sont engainées par des cellules de type B qui forment de véritables "tubes" dans lesquels les neuroblastes peuvent se déplacer (Peretto et al., 1997). Ces cellules de type B possèdent des caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales d'astrocytes, incluant un cytoplasme peu dense, des jonctions serrées, des granules de glycogènes et bien sur l'expression de la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)

(Doetsch et al., 1997). De façon intéressante, certaines cellules de type B ont même la capacité de proliférer. Dispersés le long de ces chaînes on retrouve aussi, au niveau de la SVZ, de petits clusters de cellules hautement proliférantes nommées cellules de type C (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 1999b).

Malgré la description des types cellulaires présent dans la SVZ, l'identification précise des cellules souches neurales, *in vitro*, et des précurseurs primaire des neurones, *in vivo*, n'a été obtenue qu'à partir de 1999. Pour identifier ces cellules, l'équipe d'alvarez-buylla a décidé d'une part d'éliminer les cellules proliférantes puis de regarder séquentiellement la régénération de cette zone afin de déterminer l'ordre de réapparition des différents types cellulaires. Ainsi, après 6 jours d'infusions cérébrales d'Ara-C, une drogue anti-mitotique, les neuroblastes (type A) et les cellules hautement proliférantes (type C) sont totalement détruites. Cependant, ce traitement épargne la majorité des astrocytes (type B, ceux qui n'ont pas proliféré pendant le traitement) ainsi que les cellules épendymaires (Doetsch et al., 1999b). De façon tout à fait inattendue, les premières cellules commençant à proliférer, douze heures après l'arrêt du traitement Ara-C, présentent les caractéristiques des cellules de type B, c'est-à-dire d'astrocytes (Doetsch et al., 1999a). Cette activation cellulaire aurait pu être le résultat d'une gliose réactionnelle. Cependant, si l'on réalise un marquage des ces astrocytes proliférants par thymidine tritiée, il en résulte un marquage séquentiel des types C puis des type A. Tous ces résultats suggèrent que les astrocytes proliférants dans la SVZ vont donner naissance aux cellules de type C qui à leur tour vont générer les neuroblastes de type A. Ces résultats troublants ont été étayés par une autre approche expérimentale. En effet, les astrocytes, exprimant la GFAP, peuvent être spécifiquement marqués grâce à une lignée de souris transgéniques portant le récepteur pour un rétrovirus aviaire sous le promoteur *GFAP* et l'utilisation d'un rétrovirus aviaire codant pour la phosphatase alcaline (Holland and Varmus, 1998). Après injection stéréotaxique du virus dans cette zone germinative, seuls les astrocytes de la SVZ peuvent être marqués. Par cette méthode, ils ont ainsi démontré que ce sont bien ces cellules qui génèrent des neuroblastes qui migrent jusqu'au bulbe olfactif où ils se différencient en neurones. Ceci indique que même en condition non régénérative, les astrocytes de la SVZ adulte sont aussi les précurseurs des neurones (Doetsch et al., 1999a).

Comme je l'ai dit précédemment, une sous population de cellules de la SVZ adulte peut répondre aux facteurs de croissance EGF et bFGF afin de générer des neurosphères, *in vitro*. Les astrocytes marqués de façon vitale ou ceux restant après élimination des type A et C, répondent à l'EGF et génèrent des neurosphères primaires et secondaires capable de différenciations multiples (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 2002). Ceci suggère que les astrocytes de type B correspondent, au moins en partie, aux cellules de la SVZ adulte capable de répondre à ces facteurs de croissance. De façon extrêmement intéressante, les cellules astrogliales provenant de tout le SNC (zones germinatives ou cortex ou cervelet ou moelle épinière) peuvent toutes se comporter comme des cellules souches neurales *in vitro* (Laywell et al., 2000). En effet, après avoir générer une culture d'astrocytes en monocouche de chacune de ces régions cérébrales, ceux-ci sont "décrochés" puis mis dans des conditions de culture non adhérentes en présence de facteurs de croissance. De façon inattendue, toutes ces cultures peuvent former des neurosphères multipotentes (voir article N°2). Cependant, alors que les astrocytes des zones germinatives gardent leur capacité à former des sphères chez l'adulte, ceux des autres régions du SNC la perdent 10 jours après la naissance. Ceci suggère qu'après cette période "critique", des événements, encore inconnus au début de cette thèse, conduisent à la perte des potentialités multiples de ces astrocytes.

D'autres études sont venues récemment confirmer tous ces résultats en démontrant que les cellules souches neurales exprimaient bien la GFAP *in vitro* et *in vivo*. Dans ces expériences, les auteurs ont utilisé une lignée de souris transgéniques exprimant la thymidine kinase (TK) du virus herpes simplex (HSV-TK) sous le promoteur *GFAP*. L'exposition des cellules au ganciclovir (GCV) conduit à la formation d'un métabolite toxique, uniquement dans les cellules astrocytaires proliférantes. L'infusion, *in vivo*, de GCV dans les souris *GFAP*-TK pendant trois jours, ou *in vitro* dans les cultures d'astrocytes, conduit à une disparition quasi complète des cellules formant les neurosphères dans la SVZ et de la neurogenèse adulte *in vivo* (Garcia et al., 2004; Imura et al., 2003). Ces résultats confirment que les astrocytes de la SVZ adulte se comportent comme des cellules souches neurales.

Une autre équipe a suggéré que les cellules épendymaires pourraient jouer le rôle de cellules souches neurales adultes (Johansson et al., 1999). Cependant, aucune autre équipe n'a jamais pu confirmer que ces cellules pouvaient

effectivement incorporer des marqueurs mitotiques chez l'adulte, ou quelles pouvaient jouer le rôle de précurseurs primaires de neurones. L'hypothèse des astrocytes comme cellules souches neurales adultes est, en outre, supportée par des études de plus en plus nombreuses (Ahn and Joyner, 2005; Chiasson et al., 1999; Garcia et al., 2004 ; Imura et al., 2003; Irvin et al., 2001; Laywell et al., 2000; Morshead et al., 2003).

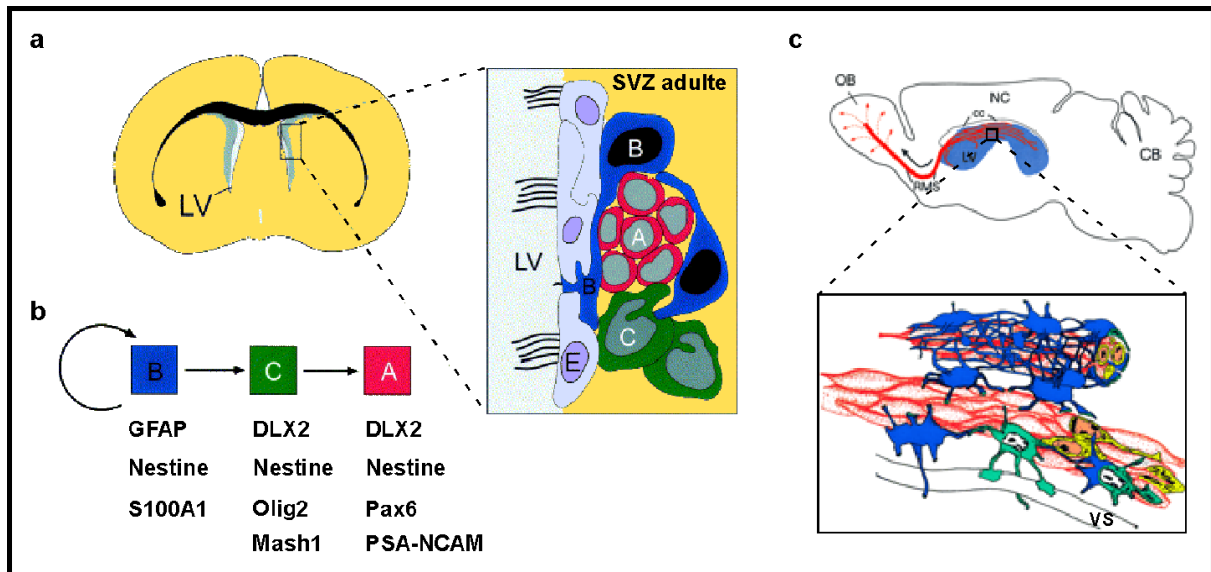


Figure 9: Organisation de la zone sous ventriculaire (SVZ) adulte.

a- La SVZ adulte se compose de neuroblastes (type A, rouge) organisés en chaînes, entourés par des astrocytes (type B, bleus) proliférants rarement. Des cellules à haut pouvoir prolifératif (type C, vert) sont aussi adjacent à ces chaînes. Les cellules épendymaires (type E, violet) délimitent le ventricule latéral (LV). Parfois, les cellules de type B réalisent une extension ciliée dans ce ventricule. **b-** Représentation du lignage cellulaire dans la SVZ adulte avec les cellules de type B qui produisent les cellules de type C qui en retour génèrent des cellules de type A. Les principaux marqueurs et les facteurs de transcriptions caractérisant ces différents types cellulaires sont aussi indiqués. **c-** Représentation de la voie de migration rostrale (RMS). Les neuroblastes (rouge) migrent en chaînettes le long du mur ventriculaire puis empruntent une voie de migration commune nommée RMS afin d'atteindre le bulbe olfactif (OB) où ils se différencieront en interneurons olfactifs. Ces neuroblastes sont totalement engainés par les cellules astrocytaires (bleu). NC. Néocortex; VS. Vaisseau Sanguin; CB. Cervelet, CC. Corps calleux. (Modifié d'après Alvarez-Buylla et Doetsch, 2002)

4.2.2 La zone sous granulaire de l'hippocampe adulte

La zone sous granulaire (SGL) du gyrus denté de l'hippocampe est la seconde zone de neurogenèse chez l'adulte. Contrairement à la SVZ, la SGL n'est pas localisée à proximité d'un mur ventriculaire, mais à l'intérieur de l'hippocampe à l'interface entre le hilus et la couche de cellules granulaires (Figure 10). Des études *in vitro*, ont suggéré que l'hippocampe adulte pourrait contenir des cellules souches adultes (Gage, 2000; Gage et al., 1998; Palmer et al., 1997), cependant l'identité des cellules, *in vivo*, qui donnent naissance à ces cellules souches, *in vitro*, est restée pendant longtemps inconnue.

Des premières études avaient identifiées de petites cellules sombres, d'apparence "indifférenciées" à l'intérieur de la SGL, comme étant les progéniteurs de neurones (Altman and Das, 1965; Kaplan and Bell, 1984). En outre, d'autres travaux ont aussi démontré que les cellules astrocytaires continuent à se diviser dans la SGL adulte (Cameron et al., 1993; Palmer et al., 2000). Cependant, ce processus a été attribué, à l'époque, à une gliogenèse locale nécessaire au maintien des fonctions neuronales. Plus tard, de nouveaux travaux viendront modifier cette conception en suggérant que comme pour la SVZ, les astrocytes adultes de la SGL pourraient aussi être les précurseurs primaires de neurones (Seri et al., 2001). Deux catégories d'astrocytes ont été décrites dans le gyrus denté adulte: des astrocytes à morphologie radiale et des astrocytes à morphologie horizontale. Les deux expriment la GFAP, toutefois seuls les astrocytes radiaires expriment la protéine Nestine, caractéristique des progéniteurs neuraux (Filippov et al., 2003). Les astrocytes radiaires ont leur corps cellulaire dans la SGL ainsi qu'une longue extension traversant la couche granulaire (Figure 10). D'un point de vue ultra-structural, ces cellules possèdent des caractéristiques d'astrocytes similaires à ceux de la SVZ (Seri et al., 2001). Juste après l'incorporation de BrdU, un marqueur de synthèse d'ADN, près de la moitié des cellules marquées dans la SGL correspond aux astrocytes (Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001). A l'inverse, si l'animal est sacrifié plusieurs heures après l'incorporation de BrdU, le nombre de cellules ayant incorporé cet analogue de base mais négatives pour la GFAP, augmente considérablement et caractérise la population de petites cellules sombres (type D ou Type 2, Figure 10) (Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001). Ces cellules de type D, ou 2, ne correspondent

pas aux précurseurs primaires de neurones mais aux progéniteurs intermédiaires qui proviennent de la division des astrocytes radiaires. Ceci a été démontré en utilisant la même méthodologie que pour la SVZ, c'est-à-dire un traitement antimitotique à l'Ara-C ainsi que l'utilisation de souris transgénique exprimant le récepteur d'un virus aviaire sous le promoteur GFAP (Seri et al., 2001). Des travaux plus récents ont ensuite confirmés qu'*in vivo*, les cellules exprimant la GFAP sont bien à l'origine de la neurogenèse de l'hippocampe adulte (Garcia et al., 2004, Ahn et al., 2005).

Les événements cellulaires de la neurogenèse de l'hippocampe ont pu être décryptés par la suite. Les astrocytes germinatifs génèrent un progéniteur neuronal de type D qui possède des propriétés électrophysiologiques de jeunes neurones (Kempermann et al., 2004). Ce progéniteur évolue ensuite progressivement dans sa différenciation neuronale, en exprimant séquentiellement des marqueurs neuronaux tels que doublecortine, PSA-NCAM, NeuroD, Prox1, et NeuN, afin de devenir un neurone granulaire mature. Les différents stages de maturation de ces cellules ont ensuite été classifiées en trois sous types : D1, D2, D3 (Figure 10, Kempermann and Gage, 2000; Kempermann et al., 2004).

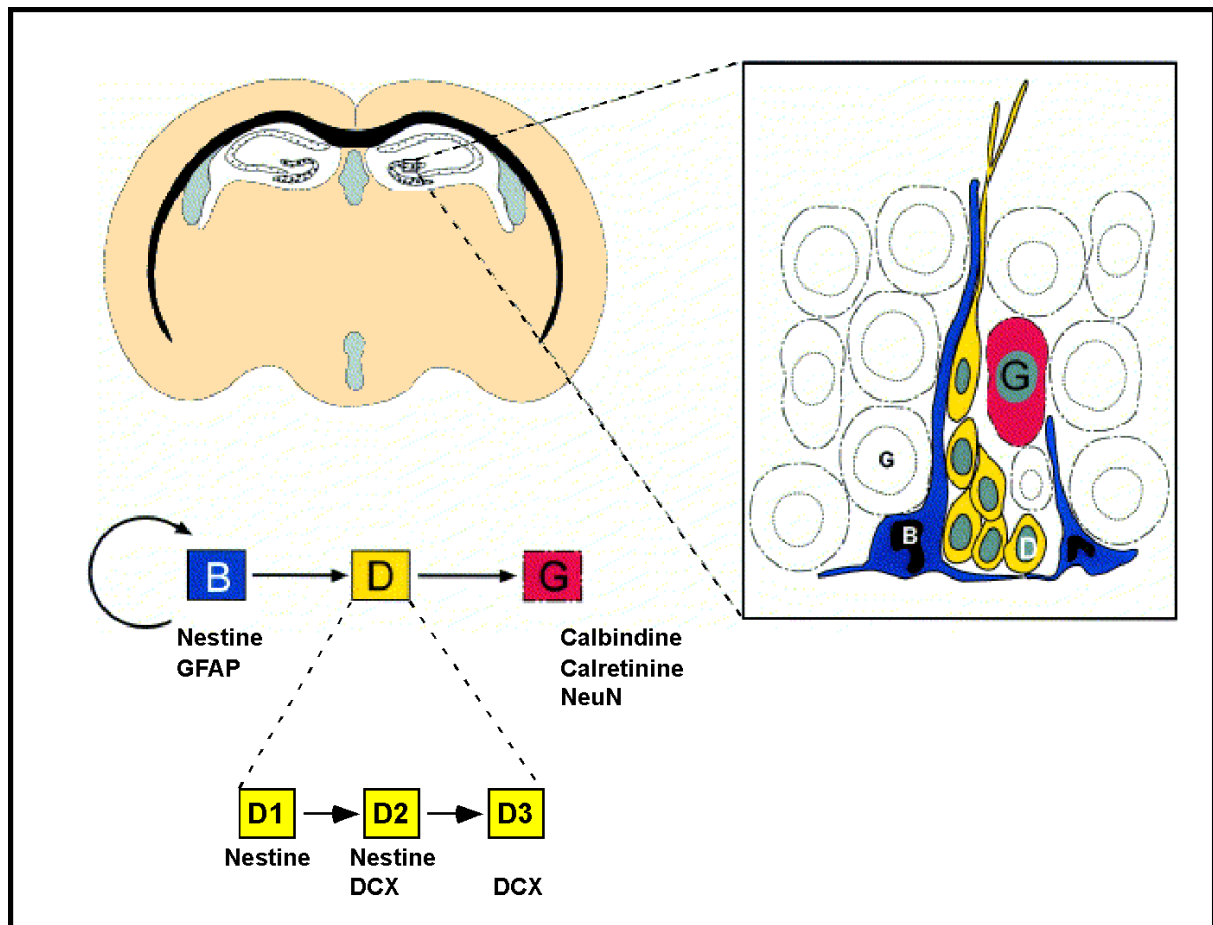


Figure 10: Organisation de la zone sous granulaire (SGL) de l'hippocampe adulte.

Les astrocytes de la SGL (type B, bleus) possèdent une morphologie radiale avec une extension pénétrant dans la couche de neurones granulaires (Type G, rouge). Les cellules de type B prolifèrent et génèrent des neuroblastes immatures (cellules sombres, type D, jaune) qui se divisent pour donner des neurones matures granulaires . DCX : doublecortine. (modifié d'après Seri et al., 2001).

4.3 Les précurseurs primaires neuraux au cours du développement embryonnaire et post-natal

Contrairement aux dogmes de la neurobiologie, les résultats obtenus chez l'adulte démontrent que 1) une neurogenèse peut s'effectuer chez l'adulte 2) des précurseurs (*in vivo*) ayant des propriétés de cellules souches (*in vitro*) sont retenus chez l'adulte 3) les cellules souches neurales adultes possèdent des caractéristiques de cellules astrocytaires différenciées et donnent naissance à des neurones.

Si ces travaux bouleversent de nombreux concepts, l'étude de l'origine développementale des cellules souches neurales astrocytaires permettra de mieux comprendre et accepter les résultats obtenus chez l'adulte.

4.3.1 La glie radiale : morphologie et caractéristiques astrogliales

Les cellules souches neuroépithéliales (NE) de la zone ventriculaire sont les cellules les plus précoces du cerveau en développement, formant la plaque et le tube neural. Elles génèrent un grand nombre de cellules neuronales et gliales au cours du développement embryonnaire précoce. Les cellules de la glie radiale sont ensuite les premières cellules qui peuvent être distinguées des cellules NE. Elles sont d'ailleurs considérées comme provenant directement des cellules NE (Gotz et al., 2002). En effet, la glie radiale et les cellules NE partagent de nombreuses caractéristiques : elles réalisent leur mitose avec une migration de leur noyau de la SVZ vers la zone ventriculaire (migration interkinétique), elles possèdent un pied ventriculaire avec un petit cil dans la lumière du ventricule et elles expriment le filament intermédiaire Nestine (couramment utilisé pour caractériser les cellules souches neurales en culture) ainsi qu'un épitope particulier de nestine qui est RC2 (Bentivoglio and Mazzarello, 1999; Gotz et al., 2002; Rakic, 2003).

Les cellules de la glie radiale apparaissent au commencement de la neurogenèse (vers E9-E10 chez la souris). Ces cellules ont leur corps cellulaire localisé au niveau de la zone ventriculaire et étendent une longue extension jusqu'à la surface du cerveau, ou pia (Figure 11). Cette morphologie particulière et allongée est à l'origine du terme "radial". Le terme de "glie" vient du fait que ces cellules partagent des caractéristiques phénotypiques et structurales avec des cellules gliales différenciées telles que des granules de glycogènes, des jonctions serrées et

l'expression de marqueurs gliaux comme la GFAP (chez les primates mais pas chez les rongeurs), les protéines BLBP (*Brain Lipid Binding Protein*), GLAST (*GLutamate Astrocyte Specific Transporter*) ou ténascine (Bignami and Dahl, 1974; Choi and Lapham, 1978; Feng et al., 1994; Garcion et al., 2004; Levitt and Rakic, 1980; Shibata et al., 1997).

De part sa morphologie, la glie radiale permet un contact entre la zone ventriculaire et la surface du cerveau. Pendant la période de neurogenèse corticale (E10-E17 chez la souris), cette forme extrêmement allongée sert "d'échafaudage" aux neurones nouvellement produits qui vont migrer le long de cette extension pour coloniser les différentes parties du cerveau (Figure 13b, 14c) (Gotz et al., 2002; Rakic, 2003). Au moment de la gliogenèse, plus tardive dans le développement (E18 chez la souris), la glie radiale perd son pied ventriculaire et rétracte son extension afin de pénétrer dans le parenchyme et se transformer en astrocytes étoilés ou protoplasmiques (Figure 11) (Levitt and Rakic, 1980; Rakic, 2003; Voigt, 1989). L'observation de la transformation de la glie radiale en astrocytes multipolaires a considérablement consolidé le lien filiatif entre ces deux types cellulaires. Ces morphologies transitoires ont été détectées, dans un premier temps, par Koelliker et Lenhossek puis grâce à des études immunohistochimiques utilisant les marqueurs vimentin, GFAP et synemin (Bentivoglio and Mazzarello, 1999; Kalman et al., 1998; Pixley and de Vellis, 1984; Sultana et al., 2000). La meilleure démonstration expérimentale de cette transformation fut obtenue grâce à des études réalisées sur le cortex cérébral de furets. Dans ces expériences, la glie radiale fut marquée avec des traceurs fluorescents déposés à la surface du cerveau. Lorsque le cerveau est analysé à des temps plus tardifs, les astrocytes corticaux se retrouvent alors marqués par ce même traceur (Voigt, 1989). *In vitro*, la glie radiale peut aussi acquérir une morphologie d'astrocyte multipolaire (Culican et al., 1990) et ce processus est réversible lorsque les conditions de culture sont appropriées (Hunter and Hatten, 1995).

Les différentes voies de l'astrogliogenèse sont encore peu connues. Toutefois il est évident qu'une partie, au moins, des astrocytes que l'on retrouve dans le télencéphale provient d'une transformation directe et progressive des cellules de la glie radiale. Une autre partie proviendrait de progéniteurs gliaux, issus de la glie radiale, qui sortiraient de la SVZ postnatale pour aller coloniser le parenchyme (Figure 12) (Marshall et al., 2003).

En conclusion, de nombreuses données moléculaires, ultrastructurales et développementales supportent l'idée de l'existence d'un lien filiatif fort entre la glie radiale et les astrocytes du SNC adulte.

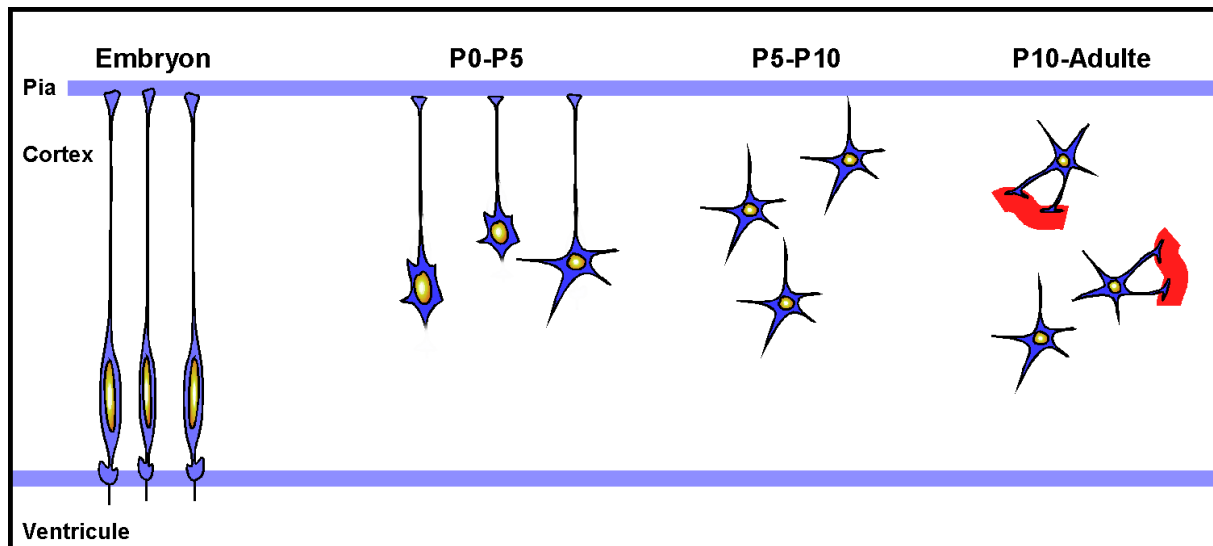


Figure 11: Transformation séquentielle de la glie radiale en astrocytes.

A- Au cours des phases embryonnaires, les cellules de la glie radiale possèdent une morphologie allongée leur permettant d'une part de réaliser un pied ventriculaire et d'autre part de venir au contact de la surface du cerveau, ou pia grâce à leur extension. **B-** Après la naissance, les phases de gliogenèse se déroulent et les cellules de la glie radiale détachent leur pied ventriculaire et se rétractent sur leur extension pénétrant ainsi progressivement dans le parenchyme. Des transformations morphologiques génèrent un aspect de plus en plus ramifié. **C-** Entre P5 et P10, les astrocytes immatures sont détachés de la surface du cerveau et arborent une morphologie étoilée. **D-** Après la première semaine post-natale, les astrocytes réalisent pleinement leur fonction, notamment en participant à la formation de la barrière hémato-encéphalique, via la création de pieds astrocytaires sur les vaisseaux sanguins (rouge).

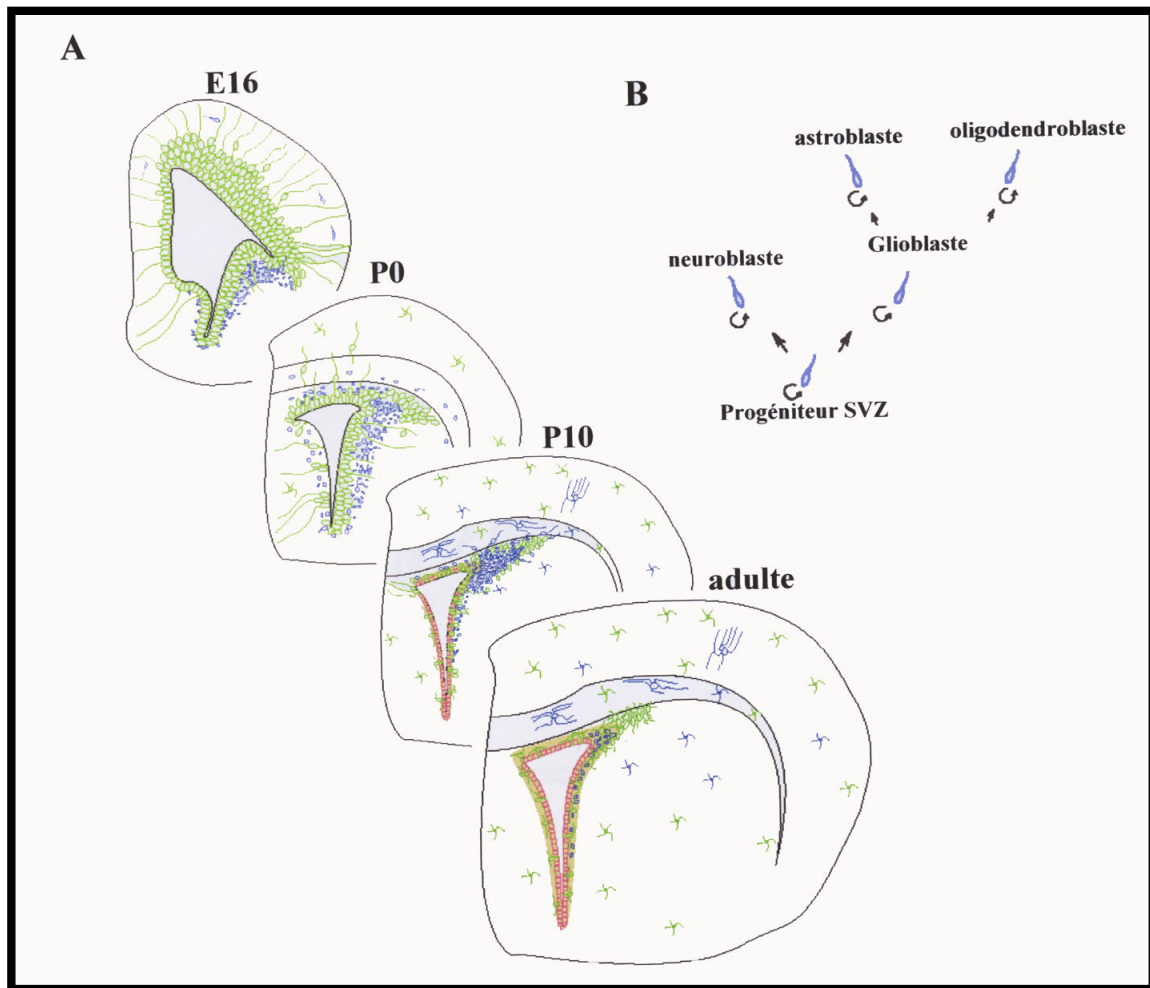


Figure 12 : Formation de cellules gliales à partir de progéniteurs gliaux de la zone sous ventriculaire.

A- Au cours du développement, les progéniteurs gliaux (bleu) apparaissent au niveau de la région du ventricule latéral puis après la naissance au niveau dorsal. **B-** Ces progéniteurs gliaux vont ensuite quitter cette zone sous ventriculaire (SVZ) pour aller coloniser les différentes parties du télencéphale (striatum, cortex, corps calleux) et se différencier en astrocytes ou en oligodendrocytes (modifié d'après Marshall et al., 2003).

4.3.2 La glie radiale : Des précurseurs neuraux du cerveau en développement

La découverte de cellules souches neurales adultes possédant des caractéristiques de cellules gliales astrocytaires a ouvert de nouvelles perspectives quant à l'origine des précurseurs neuraux au cours du développement. Ainsi, ces cinq dernières années, toute une série d'études ont pu démontrer que les cellules de la glie radiale sont non seulement capables de se diviser mais aussi de générer un grand nombre de cellules composant le SNC telles des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones. La glie radiale isolée à partir du néocortex de souris ou de rat peut, *in vitro*, produire des neurones et des cellules gliales (Gotz et al., 2002; Rakic, 2003). De façon intéressante, en fonction de la période développementale où la glie radiale est prélevée, les potentialités de différenciation, *in vitro*, de celle-ci sont modifiées. Ces potentialités, *in vitro*, suivent les grandes phases du développement du SNC, *in vivo*. Ainsi, la glie radiale produit de nombreux clones contenant des neurones si elle est prélevée pendant la période de neurogenèse ; à l'inverse, si elle est prélevée après ce pic de neurogenèse elle génèrera des colonies mixtes ou composées de cellules gliales exclusivement (Gotz et al., 2002; Kriegstein and Gotz, 2003; Liu and Rao, 2004; Malatesta et al., 2003; Marshall et al., 2003; Rakic, 2003). Ceci suggère que la glie radiale possède des propriétés de précurseurs pouvant générer à la fois des neurones et des cellules gliales ; mais aussi que ses potentialités de différenciation varient avec l'avancement des phases développementale.

Les preuves les plus directes démontrant la fonction de précurseur neuronal de la glie radiale proviennent d'expériences réalisées par l'équipe du Dr. Kriegstein. En 2001, cette équipe a visualisé directement, sur coupes organotypiques, la destinée d'une glie radiale infectée par un rétrovirus, codant pour une protéine fluorescente (Noctor et al., 2001). Avec cette approche, ils ont pu observer en direct, la division asymétrique de la glie radiale corticale produisant un neurone post-mitotique qui va ensuite migrer dans le cortex (Figure 13).

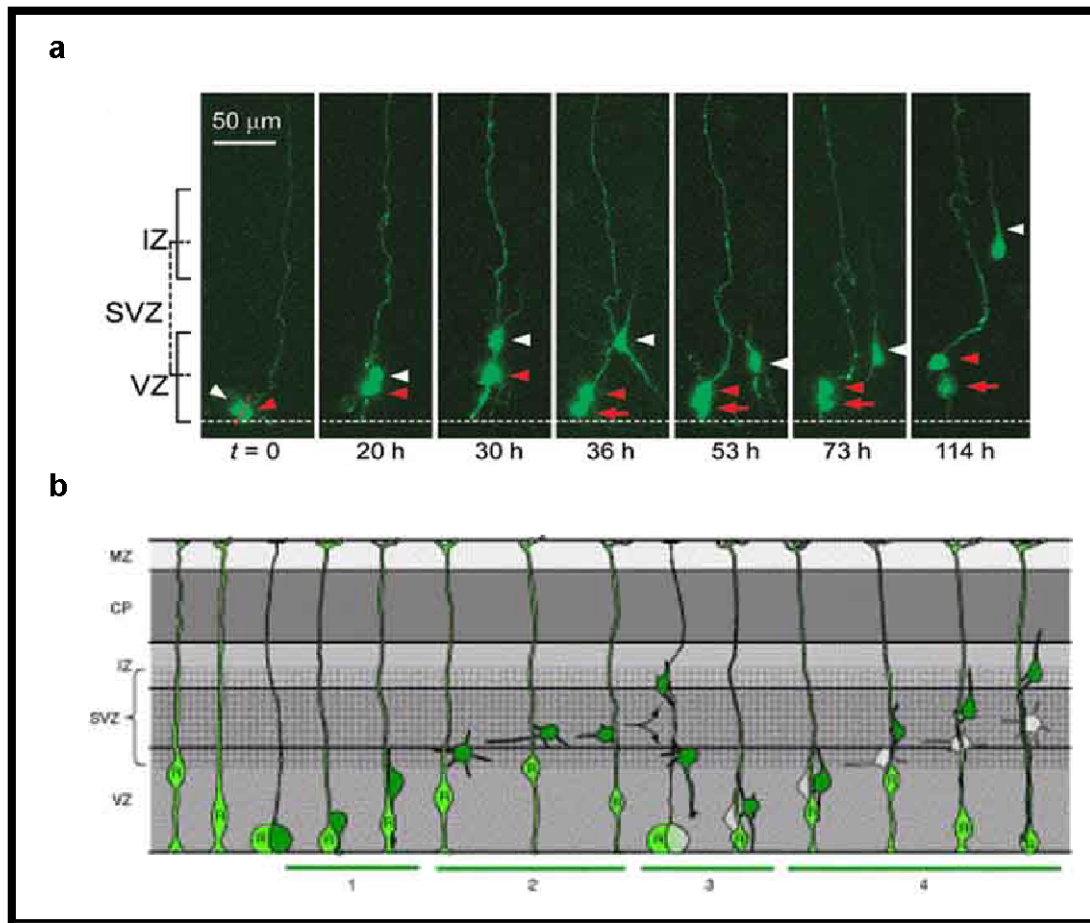


Figure 13: La glie radiale génère des neurones au cours du développement.

a- Une cellule de la glie radiale (GR, tête de flèche rouge), se divise de façon asymétrique au niveau de la zone ventriculaire (VZ) pour générer une cellule fille neuronale (tête de flèche blanche). Cette GR reste mitotique et produit une autre cellule neuronale (flèche rouge). **b-** Description détaillée des phases de production et de migration de neurones issus de la GR. **Phase 1**, mouvement radial du neurone néo-synthétisé (vert foncé) de la VZ vers la zone sous ventriculaire (SVZ). **Phase 2**, le neurone devient bipolaire et stoppe sa migration dans la zone intermédiaire (IZ) et dans la SVZ. Certains neurones entament la **phase 3** consistant en un mouvement rétrograde vers la VZ. **Phase 4**, migration radiale finale vers la plaque corticale (CP) guidée par les fibres radiales. La GR reste mitotique, réalise une migration nucléaire interkinétique puis génère une cellule fille additionnelle (gris clair). (D'après Noctor SC, 2004, Kriegstein 2004).

Des travaux encore plus récents de cette même équipe ont aussi démontré que la glie radiale se divise de façon asymétrique pour produire soit un neurone post-mitotique soit un progéniteur neuronal (Figure 14). Ainsi la cellule fille produite par la glie radiale se déplace de la zone ventriculaire vers la SVZ corticale pour se diviser encore une fois et produire deux neurones. Cette observation est extrêmement importante car ce mécanisme de production neuronal est totalement réminiscent de celui utilisé pour produire des neurones au niveau de la SVZ et SGL adulte ; où un précurseur primaire (de nature gliale) donne naissance à une cellule proliférative qui elle-même se divise pour générer des neurones (Noctor et al., 2002; Noctor et al., 2004).

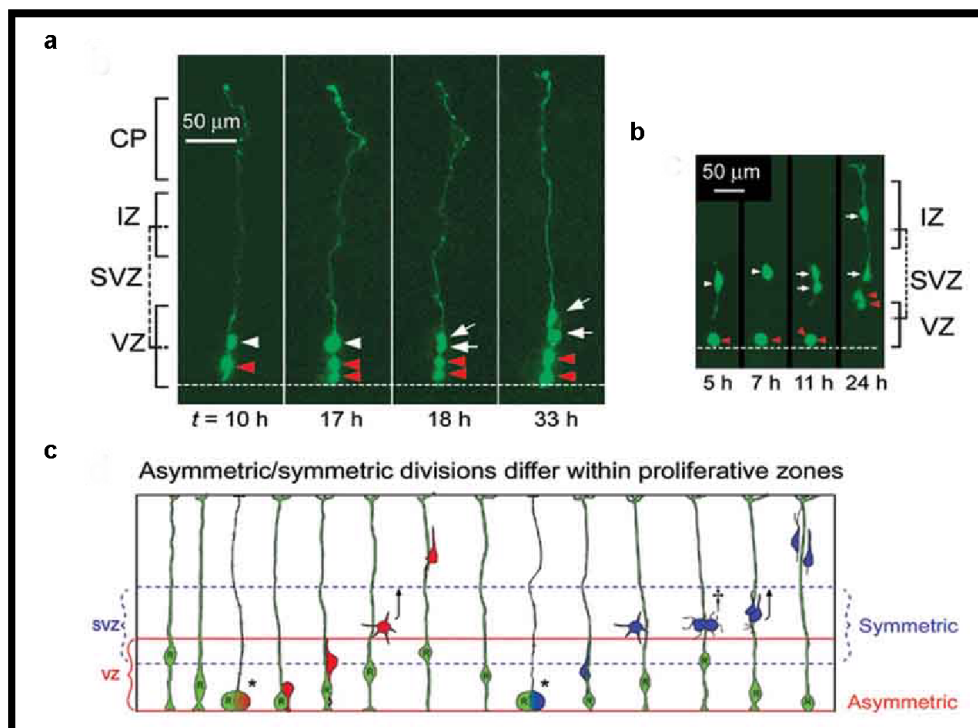


Figure 14: La glie radiale génère par division asymétrique des progéniteurs intermédiaires qui se divisent de façon symétrique.

a- La glie radiale (GR, tête de flèche rouge) génère par division asymétrique, dans la zone ventriculaire (VZ), un progéniteur intermédiaire (tête de flèche blanche) qui lui se divise de façon symétrique dans la zone sous ventriculaire (SVZ) pour donner naissance à deux neurones (flèches blanches) qui migrent vers la plaque corticale (CP). **b-** Autre exemple de division symétrique dans la SVZ suivie par une division asymétrique de la cellule mère. Il est à noter que la GR mère réalise une division dans les 24 heures. **c-** Schéma représentant les différents modes de production de neurones à partir de la GR. L'astérisque représente la GR neurogénique dans la VZ. (D'après Noctor SC, 2004, Kriegstein 2004).

Deux autres études, utilisant des modèles de souris transgéniques, ont permis de suivre la filiation de la glie radiale. Ces travaux ont élargi ces données à l'ensemble du télencéphale en démontrant que la plupart des neurones du télencéphale étaient issus de la glie radiale (Anthony et al., 2004; Malatesta et al., 2003).

La notion qu'une glie radiale est juste une cellule de soutien à la migration des neurones supportant le développement embryonnaire doit être complètement reconsidérée, puisque ces cellules sont aussi les précurseurs primaires d'un très grand nombre de neurones. Ce nouveau concept a des implications immenses pour la compréhension des événements moléculaires et cellulaires contrôlant le développement du SNC.

Contrairement à ce que l'on pouvait imaginer, c'est le type cellulaire embryonnaire avec la morphologie cellulaire la plus élaborée et les caractéristiques de cellules "différenciées" (longue extension radiale, contact avec des vaisseaux sanguins, cytosquelette complexe) qui joue le rôle de précurseurs primaire de neurones *in vivo*.

De récents travaux semblent indiquer que ces cellules seraient les précurseurs des cellules souches neurales adultes, révélant ainsi un lignage "glial" des cellules souches du système nerveux central.

4.3.3 Les cellules souches neurales : un continuum de l'embryon à l'adulte ?

Toutes les données précédentes indiquent que des cellules qui ont été classiquement considérées comme différenciées, chez l'embryon comme chez l'adulte, correspondent aux précurseurs primaires de neurones. Jusqu'à récemment, le lignage cellulaire conduisant à la formation des neurones et des cellules gliales était considéré comme étant séparé très tôt au cours du développement embryonnaire. Dans cette conception "traditionnelle", les astrocytes et la glie radiale appartiennent à une voie gliale, alors que les neurones appartiennent à une voie neuronale distincte (Figure 8). Si l'on prend en compte les expériences décrites précédemment, ces notions sont, en partie au moins, modifiées. Cependant, ces résultats ne sont pas forcément si surprenant.

En effet, le lignage des cellules neuronales et gliales n'est pas toujours aussi distinctement séparé. Différents travaux, chez la drosophile par exemple, ont pu démontré que des neurones et des cellules gliales peuvent être produit après la division finale d'un progéniteur (Udolph et al., 1993). D'autres observations, chez les vertébrés, ont aussi suggéré que des cellules gliales et neuronales peuvent provenir d'un progéniteur commun (Qian et al., 1998). Cependant, il est important de noter que de nombreuses études continuent, encore actuellement, à supporter la théorie de progéniteurs gliogéniques ou neurogéniques restreints (Liu et al., 2002; Marshall et al., 2003; Mayer-Proschel et al., 1997; Mujtaba et al., 1999). Ceci n'est pas forcément contradictoire, et un modèle conciliateur pourrait être que les progéniteurs restreints dans leur lignage et les cellules souches multipotentes peuvent co-exister dans le cerveau et que ces deux théories ne représentent pas des idées exclusives.

Deux idées majeures suggèrent que les cellules souches neurales sont contenues dans un "lignage glial". Tout d'abord, la démonstration que la glie radiale peut être un précurseur non seulement d'astrocytes mais aussi de neurones, *in vivo*, et d'oligodendrocytes, *in vitro*. Ensuite, l'identification de précurseurs multipotents, dans le cerveau adulte, possédant des caractéristiques astrogliales et permettant une neurogenèse adulte. Ceci, ne veut absolument pas dire que toutes les cellules possédant des caractéristiques astrogliales sont des cellules souches. En effet (et c'est ce qui est paradoxal), le terme "d'astrocytes" a toujours été utilisé afin de décrire des cellules du parenchyme qui ont des fonctions passives de soutien du SNC, qui ne se divisent pas en conditions physiologiques et qui sont, bien entendu, totalement différenciées. Cependant, il est évident qu'un potentiel de "cellules précurseurs" est conservé par certains astrocytes, c'est pourquoi il a été suggéré qu'il devait exister très certainement un continuum des cellules souches neurales de l'embryon jusqu'à l'adulte, afin de former un "lignage glial de cellules souches" (Alvarez-Buylla et al., 2001; Campbell and Gotz, 2002; Doetsch, 2003a; Tramontin et al., 2003). Toutefois pour clairement établir l'existence de ce continuum, il reste à déterminer quelles cellules, dans le cerveau embryonnaire, sont à l'origine des cellules souches neurales adultes.

L'hypothèse la plus attrayante, et la plus évidente aussi, serait de penser que la glie radiale évolue directement en astrocytes des zones germinatives. Pour démontrer cette hypothèse, des études viennent récemment d'être effectuées. En effet, chez la souris, comme chez d'autres mammifères, la glie radiale persiste au

niveau du mur ventriculaire latéral (la future SVZ), juste après la naissance (Tramontin et al., 2003). Afin de tester l'hypothèse décrite précédemment, l'équipe d'Alvarez-Buylla a développé une technique permettant de marquer spécifiquement cette population afin de suivre son devenir ainsi que celui de sa progénie. Pour cela, ils ont utilisé un virus exprimant l'ADN recombinase, CRE, qu'ils ont injecté dans le striatum de souris transgéniques portant un gène rapporteur fluorescent devant un codon stop qui est encadré par des sites de recombinaison reconnus par l'enzyme CRE (sites lox). Comme la glie radiale latérale, projette ses extensions au niveau du striatum, celle-ci se retrouve spécifiquement marquée après l'injection virale. L'étude, à différents temps après l'injection, a démontré que la glie radiale marquée donne bien naissance aux cellules épendymaires, aux interneurons granulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif ainsi qu'aux astrocytes du striatum et de la SVZ adulte (Merkle et al., 2004). Ces données sont totalement en accord d'une part avec le fait que la glie radiale est un précurseur d'astrocytes et d'autre part avec les données récentes démontrant un rôle de précurseur neuronal (Kriegstein and Gotz, 2003). De façon très intéressante, cette équipe a pu aussi démontrer que cette glie radiale donne naissance à un autre type cellulaire qui n'était pas forcément connu comme dérivant de la glie radiale latérale : les oligodendrocytes. Ces résultats sont totalement en accord avec les observations obtenues par l'équipe du Dr. Magdalena Gotz qui a étudié la descendance de toutes les cellules de la glie radiale. Pour cela, cette équipe a croisé une lignée de souris exprimant l'enzyme CRE sous le promoteur de la protéine GFAP humaine (*hGFAP-CRE*) avec une autre lignée exprimant un gène rapporteur devant un codon stop encadré par deux sites lox. Au cours du développement embryonnaire, le gène *hGFAP* s'exprime spécifiquement dans la glie radiale de souris, ainsi après la recombinaison, toutes les cellules issues de la glie radiale expriment le gène rapporteur. Cette équipe a ainsi pu mettre en évidence la capacité neurogénique et oligodendrogénique de la glie radiale embryonnaire (Malatesta et al., 2003).

Tous ces résultats démontrent que la glie radiale possède des caractéristiques de cellules multipotentes *in vivo*. Cependant, ces observations ont été faites sur l'ensemble de la glie radiale soit de la SVZ latérale soit de tout le télencéphale et donc on ne peut pas exclure que ces différences dans la différenciation cellulaire ne soit pas due à l'existence de différentes sous populations de glie radiale. Ainsi, il demeure primordial de déterminer si une cellule unique de la glie

radiale est aussi multipotente *in vivo*. Cependant, lorsqu'une cellule marquée de la glie radiale est mise en culture, dans des conditions adéquates, elle est capable de générer des neurosphères multipotentes donc de posséder des propriétés de "vraie" cellule souche, *in vitro*.

Le résultat majeur de ces études est l'obtention d'une preuve directe de la transformation progressive des cellules de la glie radiale latérale en astrocytes germinatifs de la SVZ adulte. Ceci supporte fortement l'hypothèse d'un "lignage glial" dans lequel les cellules souches neurales seraient contenues.

4.4 Mécanismes moléculaires contrôlant la zone sous ventriculaire adulte

Si l'existence d'une neurogenèse adulte n'est plus à démontrer, les questions fondamentales qui en découlent concernent les mécanismes moléculaires contrôlant cette spécification neurale. En effet, comment des cellules neuronales sont produites à partir des zones germinatives, quels facteurs contrôlent leur différenciation, y a-t-il plusieurs catégories de neurones produits, y a-t-il une gliogenèse associée sont autant de questions posées à l'heure actuelle.

Pour cela, l'idée d'un continuum dans le lignage cellulaire glial a ouvert de nouvelles perspectives quant à la compréhension de la neurogenèse adulte. En effet, si les cellules souches neurales adultes évoluent au sein d'un lignage, il est alors possible d'imaginer que celles-ci utilisent les mêmes machineries transcriptionnelles pour s'activer et se spécifier qu'au cours du développement.

Dans l'embryon, de récentes découvertes ont permis de démontrer l'implication de facteurs de transcription avec un motif bHLH (*basic helix-loop-helix*), dans le contrôle de la prolifération, la spécification et la différenciation des progéniteurs du télencéphale, lors de la formation du SNC (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003). Les protéines bHLH se lient à l'ADN de façon hétérodimérique après avoir formé un complexe avec les protéines E (Cabrera and Alonso, 1991; Johnson et al., 1992; Massari and Murre, 2000). La séquence de liaison à l'ADN se situe en général sur une "boîte E", cependant certains peuvent se fixer sur une "boîte N" ou n'ont pas de site de liaison à l'ADN (Figure 15). En fonction du facteur de transcription considéré, ils peuvent soit activer soit réprimer l'activité transcriptionnelle de gènes cibles.

L'activation des protéines bHLH entraîne alors une suite d'événements moléculaires plus ou moins irréversible nommée "cascade bHLH" conduisant à l'effet cellulaire souhaité et énoncé auparavant.

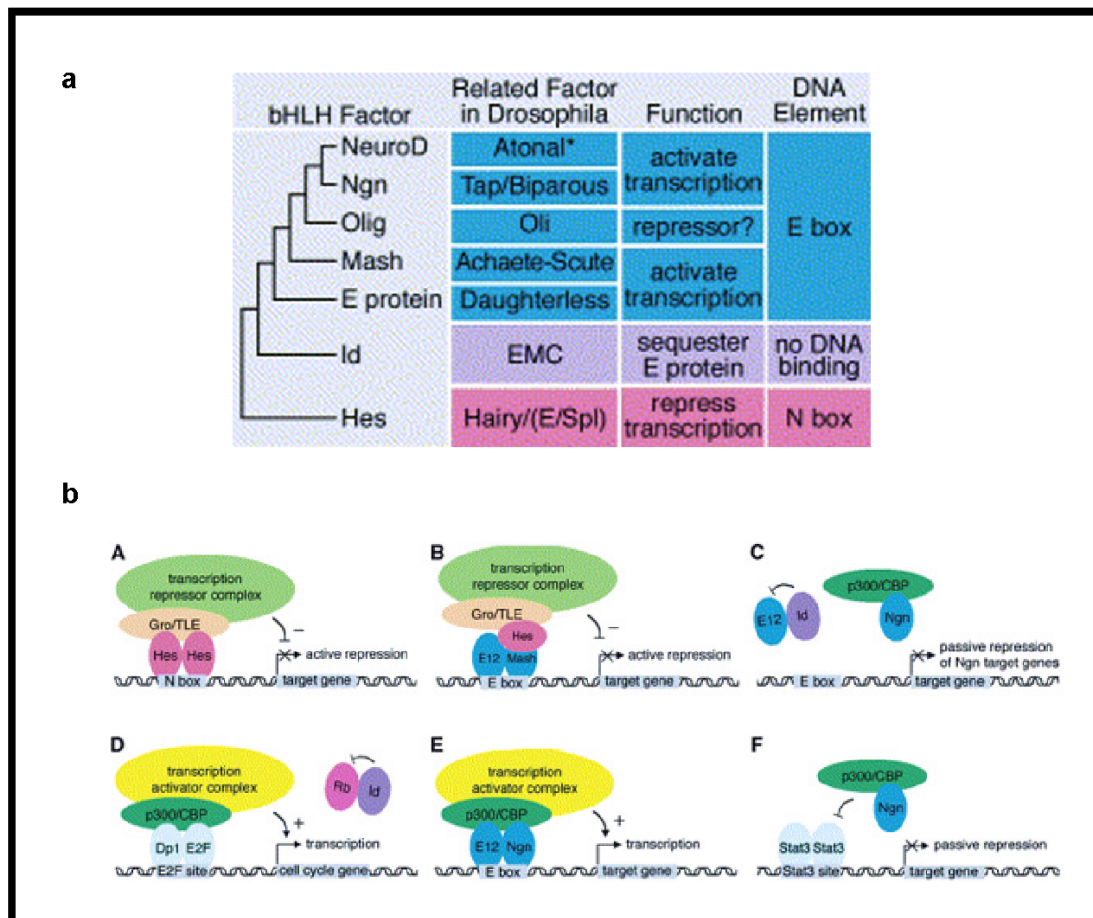


Figure 15: Mécanismes d'action des facteurs de transcription bHLH et sites de liaison à l'ADN.

a- Facteurs de transcription bHLH impliqués dans le développement neural. Représentation des fonctions et des sites de liaison à l'ADN. **b-** Mécanismes d'action des facteurs de transcription bHLH. **(A)** Les facteurs Hes forment des dimères et se lient à l'ADN sur des boîtes N (CACNAG) afin de réprimer l'expression de gènes cibles. Cette répression se fait notamment en recrutant des corépresseurs tels que Groucho/TLE. **(B)** Mash1 s'hétérodimérise avec E12 et se lie sur les boîtes E. Hes et ses corépresseurs peuvent directement se lier sur ces hétérodimères et inhiber leur activité. **(C)** Les protéines Id inhibent l'activité de facteurs bHLH en séquestrant les protéines E12. **(D)** Les protéine Id stimulent la prolifération en inhibant l'interaction de Rb avec E2F. **(E)** Le facteur Ngn s'hétérodimérise avec des protéines E12 et se fixe sur des boîtes E afin d'activer l'expression des gènes cibles. **(F)** Ngn1 peut bloquer la différenciation astrocytaire en séquestrant le complexe p300/CBP et inhibant ainsi la transactivation des gènes cibles de Stat3. (D'après Ross et al., 2003).

Différentes équipes ont ainsi cherché à déterminer d'une part les facteurs de transcription exprimés dans les cellules précurseurs et progénitrices adultes *in vitro* et *in vivo* ; et d'autre part leur rôle fonctionnel. Tout d'abord, l'équipe du Dr. Magdalena Götz a étudié, en 2004, les facteurs de transcriptions embryonnaires pouvant être exprimés par des cellules adultes formant des neurosphères. Ils ont montré notamment, que les facteurs de transcriptions de type bHLH Olig2 et Pax6 étaient présents dans ce système. Ils ont ensuite étudié leur rôle dans ce système, *in vitro*, de neurosphères (Hack et al., 2004).

Ainsi, ils ont pu démontrer, grâce à l'utilisation de siRNAs, qu'Olig2 contrôle l'auto-renouvellement des cellules formant les neurosphères puisque les cellules transfectées forment des sphères de plus petite taille et en nombre moins important. En outre, les propriétés de différenciation des neurosphères se retrouvent modifiées avec une diminution de la neurogenèse et de l'oligodendrogenèse (Hack et al., 2004).

Concernant Pax6, cette équipe avait déjà été démontré que l'expression forcée de ce facteur dans des astrocytes permettait d'induire une différenciation neuronale (Heins et al., 2002). Son expression au niveau des cellules de neurosphères mises en différenciation conduit, là aussi, ces cellules à se spécifier en neurones (Hack et al., 2004).

En 2005, deux études successives vont ensuite étudier le rôle, *in vivo*, d'Olig2 dans la zone sous ventriculaire post-natale et adulte. L'équipe de James Goldman a, tout d'abord, démontré qu'Olig2 était exprimé par les cellules gliales (glie radiale et progéniteurs gliaux) de la SVZ post-natale. Son expression persiste ensuite dans les astrocytes en devenir ainsi que dans les oligodendrocytes et leur précurseurs. Toutefois l'expression d'Olig2 disparaît finalement dans les astrocytes matures (Marshall et al., 2005). Afin de déterminer le rôle de cette protéine, l'équipe a injecté dans la SVZ post-natale des rétrovirus codant pour la protéine Olig2 sauvage ou pour une forme dominante-négative. Ils ont ainsi montré qu'Olig2 était d'une part suffisant et nécessaire pour bloquer la différenciation neuronale des cellules progénitrices de la SVZ, et d'autre part était capable de spécifier ces cellules dans une différenciation astrocytaire et oligodendrocytaire. Ces résultats mettent en évidence de nouvelles fonctions pour la protéine Olig2 et confirme l'existence d'une oligodendrogenèse post-natale à partir de cette SVZ (Figure 12) (Marshall et al., 2003).

L'étude de la fonction d'Olig2 et de Pax6 dans la SVZ adulte a été réalisée en 2005 par l'équipe du Dr. Götz. Dans la SVZ adulte, Olig2 est principalement exprimé dans les cellules à haut pouvoir prolifératif (type C). Sa surexpression au niveau de la SVZ, via l'utilisation de rétrovirus, induit une augmentation d'une oligodendrogenèse chez l'adulte au détriment de la neurogenèse (Hack et al., 2005). Ces résultats sont extrêmement importants car en étudiant les mécanismes moléculaires contrôlant la neurogenèse, cette équipe a obtenu des évidences, *in vivo*, de l'existence d'une oligodendrogenèse adulte ainsi que d'une plasticité des types C. En effet, en contrôlant les facteurs de transcription qu'elles expriment, les cellules de type C voient leur différenciation cellulaire modifiée. En outre, cette équipe a aussi pu démontrer un double rôle de Pax6 dans la SVZ adulte. Tout d'abord, Pax6 permet la formation de type A (neuroblastes) et stimule donc la neurogenèse. Cependant, selon que Pax6 reste exprimé ou non dans les neuroblastes ayant atteint le bulbe olfactif, ceux-ci vont se différencier en neurones dopaminergique ou GABAergique respectivement. Ces résultats ont été confirmés par une étude tout aussi récente réalisée par l'équipe d'Alvarez-Buylla (Kohwi et al., 2005).

Enfin une dernière équipe a étudié le rôle du facteur de transcription Mash1 dans la SVZ post-natale. Ils ont pu démontrer que Mash1 s'exprime principalement dans les cellules de type C après la naissance et chez l'adulte. Utilisant des cellules mutantes pour Mash1 et des études *in vitro* et *in vivo*, cette équipe a mis en évidence un rôle pour Mash1 dans le contrôle post-natal de la spécification neuronale et oligodendrocytaire (Parras et al., 2004).

Tous ces nouveaux résultats mettent en évidence l'importance des facteurs de transcriptions de type bHLH dans la spécification et la différenciation des cellules de la SVZ adulte. Outre l'intérêt en biologie fondamentale, sur la découverte des mécanismes moléculaires contrôlant la spécification et la différenciation des cellules précurseurs de la SVZ adulte ; ces résultats démontrent aussi que ces connaissances sont indispensable pour pouvoir "manipuler" ces cellules, peut être dans le futur, à des fins thérapeutiques.

4.5 La zone sous ventriculaire adulte : une “niche” favorable à la neurogenèse adulte ?

Dans les tissus, les cellules souches sont souvent localisées et contrôlées par un microenvironnement particulier que l'on appelle généralement “niche”. Ce milieu environnemental spécifique, permet une neurogenèse ou même des régénérations dans des régions très restreintes du SNC adulte (Emsley et al., 2005). Ces niches permettent un contrôle fin de l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que de la spécification et différenciation des progéniteurs. Elles sont généralement composées de facteurs solubles, de molécules de liaison à la membrane et de matrice extracellulaire particulière qui modulent l'adhérence et l'activité des molécules de signalisation (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Spradling et al., 2001).

Le devenir neuronal des progéniteurs de la SVZ semble intimement lié à leur environnement, bien plus qu'à un contrôle purement intrinsèque de ces cellules. En effet, la transplantation de cellules de la SVZ dans une SVZ hôte permet une production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif; cependant si ces mêmes cellules sont réimplantées dans une zone non neurogénique, elles perdent toute leur potentialité. De plus, lorsque les progéniteurs de la SGL sont réimplantés dans la RMS, ils migrent correctement et produisent les interneurones appropriés au bulbe olfactif et non à ceux de l'hippocampe (Gage, 2000; Lim et al., 2000). Donc, il semblerait que les niches de la SVZ, en plus de maintenir la population de cellules souches, contrôlent la différenciation des progéniteurs. Cette zone est donc à la fois permissive et instructive vis à vis de la neurogenèse.

Au niveau de la SVZ, l'architecture de la niche a été assez bien décrite (Figure 8). Accolés aux cellules épendymaires, les astrocytes (type B) engainent les cellules hautement proliférantes (type C) et les neuroblastes (type A). Cette zone est aussi richement vascularisée et les vaisseaux sanguins font eux aussi partie intégrante de la niche ; cependant, les cellules endothéliales et les péricytes sont séparés physiquement de la SVZ par une lame basale (Mercier et al., 2002).

4.5.1 Relation neurogenèse/vascularisation

Il y a clairement un lien entre la neurogenèse et la vasculogenèse dans le cerveau adulte. En effet, dans la SGL, la division des cellules endothéliales est spatialement et temporellement contrôlée par les groupements de neuroblastes réalisant la neurogenèse (Palmer et al., 2000). Ainsi, dans ces clusters cellulaires le récepteur au VEGF est exprimé, et l'infusion intraventriculaire de VEGF augmente la prolifération des neuroblastes au niveau de la SVZ et de la SGL. De plus, l'angiogenèse et la neurogenèse peuvent être co-régulées par les mêmes signaux comme les facteurs de croissance bFGF, VEGF, IGF-1 et TGF alpha. En outre, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs mitogènes, de différenciation et de survie neuronale tels que le bFGF, IGF-1, VEGF, PDGF, IL8 et le BDNF (Doetsch, 2003b).

4.5.2 Relation neurogenèse/cellules épendymaires

Les cellules épendymaires de la SVZ adulte, produisent la protéine noggin qui est un antagoniste de la fonction de BMP. Au cours du développement, BMP joue un rôle dans la différenciation astrocytaire, au détriment de la neurogenèse. Comme les cellules de la SVZ sécrètent du BMP et possèdent son récepteur, la production de noggin par les cellules épendymaires est primordial et contribue fortement au microenvironnement en régulant, *in vitro* et *in vivo*, la neurogenèse (Lim et al., 2000).

4.5.3 Relation neurogenèse/cellules astrocytaires

Les astrocytes sont aussi capables de sécréter des facteurs qui stimulent les cellules souches de l'hippocampe et induisent une différenciation neuronale de celles-ci (Song et al., 2002). De plus, lorsque des cellules de type B et C sont cocultivées sur une monocouche d'astrocytes, ils peuvent alors proliférer et générer des types A (Lim and Alvarez-Buylla, 1999). Les astrocytes de la SVZ sont aussi capable d'exprimer des molécules de signalisation de type ephrin (Conover et al., 2000). Des injections, intra ventriculaire, d'ephrin induisent une augmentation du nombre d'astrocytes et de la prolifération dans cette zone.

4.5.4 Relation neurogenèse/signalisation Notch

Notch 1 et son ligand jagged sont exprimés tous deux dans la SVZ et la SGL (Stump et al., 2002). Des résultats très intéressants ont été obtenus en utilisant un rétrovirus contenant une forme activée de Notch. Son injection à E9.5 permet l'apparition précoce de glie radiale ainsi que la production de denses clusters d'astrocytes au niveau de la SVZ postnatale (Gaiano et al., 2000). De plus, Notch activé semble aussi inhiber la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif, la différenciation neuronale et la prolifération cellulaire (Chambers et al., 2001).

4.5.5 Relation neurogenèse/signalisation Shh

De récentes études démontrent un rôle de Shh dans le contrôle de la neurogenèse adulte. Shh augmente la prolifération cellulaire dans la SVZ et la SGL, permet le maintien des cellules souches dans ces zones, contrôle la production d'interneurones et régule l'auto-renouvellement des cellules formant des neurosphères (Ahn and Joyner, 2005; Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005). De plus, le récepteur Gli1 au Shh est exprimé par les cellules de type B et C dans cette zone (Ahn and Joyner, 2005 ; Palma et al., 2005). Il semblerait que la signalisation Shh soit directement impliquée dans l'activation des cellules souches neurales astrocytaires permettant ainsi la production de progéniteurs de neurones mais aussi d'oligodendrocytes et d'astrocytes (Ahn and Joyner, 2005). Cette étude récente est la première à clairement démontrer, *in vivo*, la multipotence des cellules souches astrocytaires adultes sous le contrôle d'une signalisation environnementale.

4.5.6 Relation neurogenèse/signalisation EGF

Des cellules souches neurales adultes répondant à l'EGF et générant des neurosphères multipotentes ont été isolées à partir de la SVZ (Reynolds and Weiss, 1992). Les cellules exprimant le récepteur à l'EGF ont récemment été identifiées comme étant les cellules de type B et C (Doetsch et al., 2002). Le rôle exact de l'EGF dans cette zone n'est pas clairement établi, cependant l'infusion intracérébrale

d'EGF augmente la prolifération cellulaire des cellules de type C mais pas des types B, diminue le nombre de neuroblastes (type A) néoformés et/ou migrant vers le bulbe olfactif et induit un changement morphologique des cellules astrocytaires et épendymaires (Craig et al., 1996 ; Kuhn et al., 1997 ; Fallon et al., 2000 ; Doetsch et al., 2002 ; Gregg and Weiss, 2003). Ceci suggère un rôle de l'EGF dans la régulation de la neurogenèse au niveau des cellules de type C avec un contrôle de leur taux de prolifération (amplification) et de production de neuroblastes sans effet visible sur les astrocytes.

Tous ces résultats démontrent que bien au-delà de l'identité de la cellule souche neurale, le microenvironnement dans lequel elle se trouve est capital pour que son auto-renouvellement, son activation, sa différenciation et même sa migration soient régulés et adaptés aux besoins physiologiques. La compréhension de ces "niches" est primordiale pour appréhender la fonction des cellules souches neurales et des progéniteurs qui en sont issus ainsi que leurs potentiels thérapeutiques.

RESULTATS

5 Objectifs de la thèse

Le laboratoire a pour objectifs d'étudier les cellules précurseurs (cellules souches et progénitrices) du système nerveux central (SNC) adulte dans des conditions physiologiques et pathologiques. Dans ce cadre de recherche nous étudions la diversité et la fonction des calcioprotéines S100 exprimées dans ces cellules au cours de leur développement embryonnaire jusqu'à chez l'adulte. Nous avons focalisé plus particulièrement notre attention sur la régulation de l'expression des protéines S100A1 et S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogliale (OPC) et les astrocytes germinatifs adultes de la zone sous-ventriculaire (SVZ) en utilisant la souris comme modèle d'étude.

Les cellules progénitrices oligodendrogiales ou OPC, subissent différentes phases de maturation afin de devenir des oligodendrocytes matures myélinisants. Bien que produites au cours du développement embryonnaire, certaines OPC arrêtent leur maturation et persistent chez l'adulte. Leur participation pourrait s'avérer importante au cours de maladies démyélinisantes, malheureusement leur maturation semble aussi altérée dans ces conditions pathologiques. L'identification des acteurs et mécanismes moléculaires régulant cette maturation est donc nécessaire pour utiliser ces cellules dans le cadre de thérapies régénératrices suite à des démyélinisations.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié le rôle de la calcioprotéine S100B dans les cellules gliales oligodendrocytaires. Nous avons tout d'abord observé que son expression corrèle avec la maturation des OPC en oligodendrocytes. Utilisant une lignée de souris invalidees pour le gène *s100b*, nous avons pu mettre en évidence sa fonction dans la régulation de la maturation oligodendrocytaire, suite à des démyélinisations induites. Cependant, l'absence de phénotypes majeurs au cours du développement suggère une possible compensation fonctionnelle par une S100 très proche structuralement. C'est pourquoi, nous avons ensuite étudié l'expression spatio-temporelle de la protéine S100A1, la S100 la plus proche de la protéine S100B, dans la lignée oligodendrocytaire. Nous avons alors observé de fortes homologues de localisations

subcellulaires entre ces deux protéines, au cours de la maturation oligodendrocytaire , *in vitro* et *in vivo* . Afin d'étudier d'éventuelles compensations fonctionnelles entre ces deux protéines, nous avons finalement généré une lignée de souris doublement invalidées pour les gènes codant pour les calcioprotéines S100A1 et S100B.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressé au lien pouvant exister entre les cellules souches neurales astrocytaires, l'expression des isoformes S100A1 et S100B et leur état de maturation. Comme je vous l'ai exposé au cours de l'introduction de cette thèse, la nature gliale des cellules souches neurales adultes a été (et est toujours) accueillie avec un certain scepticisme de la part de la communauté scientifique. Cette réticence s'explique par le fait que cette nouvelle observation va à l'encontre d'une part des schémas classiques de la neurobiologie développementale et d'autre part de la conception des cellules souches. En effet, les cellules neuronales et gliales ont toujours été considérées comme ne pouvant provenir que de deux lignages cellulaires distincts. L'idée qu'une cellule gliale puisse donner naissance à une cellule neuronale était donc, plutôt inattendue. De plus, les scientifiques travaillant sur les cellules souches, notamment au niveau du système hématopoïétique, considèrent que celles-ci ne peuvent présenter que des caractéristiques phénotypiques d'immaturité, et certainement pas de cellules différenciées comme les astrocytes de la SVZ peuvent l'être. C'est pourquoi, tous ces nouveaux résultats obtenus dans les deux zones germinatives posent des questions fondamentales concernant la nature même de ces cellules souches et notamment en quoi elles diffèrent des astrocytes des autres régions du cerveau. Le fait que ces cellules possèdent les mêmes caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales que les astrocytes du parenchyme, qui eux sont différenciés de façon terminale, est extrêmement troublant. De nouveaux marqueurs sont maintenant nécessaires pour discriminer les différentes catégories d'astrocytes, notamment ceux pouvant fonctionner comme des cellules souches neurales, afin de mieux comprendre les mécanismes permettant à certains astrocytes adultes de posséder des propriétés de cellules souches. La découverte de l'ontogenèse de ces cellules est, en ce sens, primordiale si l'on veut comprendre l'histoire de ces cellules souches neurales adultes.

Dans cette deuxième partie de la thèse, nous avons utilisé les protéines S100A1 et S100B comme marqueurs immunologiques afin de caractériser, étudier et comparer les astrocytes germinatifs des astrocytes différenciés de façon terminale. Le but principal de cette étude était notamment de distinguer ces deux populations afin de comprendre 1) la nature des cellules souches neurales adultes 2) comment les astrocytes des zones germinatives conservent leurs propriétés de cellules souches chez l'adulte. Nous avons ainsi déterminé que les astrocytes adultes des zones germinatives sont maintenus dans un état développemental immature afin de conserver leurs propriétés de cellules souches neurales. Nous avons aussi mis en évidence la participation de l'EGF comme facteur microenvironnemental permettant ce maintien et régulant leurs capacités germinatives. Finalement, nous avons recherché les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation/spécification de ces astrocytes germinatifs. Dans ce cadre, nous avons identifié le facteur de transcription Mash1 comme étant exprimé par les astrocytes germinatifs de la SVZ et comme pouvant être impliqué dans les phénomènes de gliogenèse et de neurogenèse adulte.

Cette deuxième partie permet une meilleure compréhension des mécanismes permettant à un astrocyte de la SVZ adulte d'une part de conserver ces propriétés germinatives et d'autre part de s'activer afin de donner naissance à une cellule progénitrice.

6 Etude des calcioprotéines S100B et S100A1 dans la lignée oligodendrogliale

6.1 Article N°1 : L'expression de la protéine S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogiales corrèle avec leur entrée en différenciation oligodendrocytaire et module leur maturation

6.1.1 Introduction

La protéine S100B est une calcioprotéine exprimée au niveau du système nerveux central (SNC) à une concentration 30 à 100 fois supérieure à celle trouvée dans d'autres tissus (Kato et kimura 1985). Au niveau du SNC, la S100B est décrite comme s'exprimant majoritairement au niveau de certaines cellules gliales que sont les astrocytes, les cellules de l'épendyme ou la microglie et très rarement dans les neurones (Kligman and Hilt, 1988). Toutefois, si une immuno-réactivité "S100" dans certains oligodendrocytes différenciés a pu être démontrée, aucune étude de l'expression de cette protéine dans la lignée oligodendrocytaire, n'avait été réalisée avant le commencement de ce travail de thèse.

La protéine S100B a été décrite comme pouvant être impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies neurodégénératives, notamment parce qu'elle se trouve surexprimée dans ces pathologies. Sa fonction a aussi été intensivement étudiée à partir de cultures de lignée de cellules gliales (Griffin et al., 1998; Sheng et al., 1996), ce qui a permis de lui attribuer d'innombrables fonctions impliquées dans la modulation d'activités enzymatiques, le métabolisme énergétique, la sécrétion cellulaire, les changements de morphologies cellulaires ou la régulation de facteurs de transcription (Donato, 2001). Cependant, la ou les fonction(s), *in vivo*, de la protéine S100B est (sont) encore totalement inconnue(s).

Un constat très intéressant et non négligeable, est que l'expression de la S100B corrèle parfaitement avec les périodes de maturation du SNC, notamment chez les mammifères. Ceci laisse entrevoir un possible lien entre la maturation de cellules gliales et l'expression de la S100B par celles-ci.

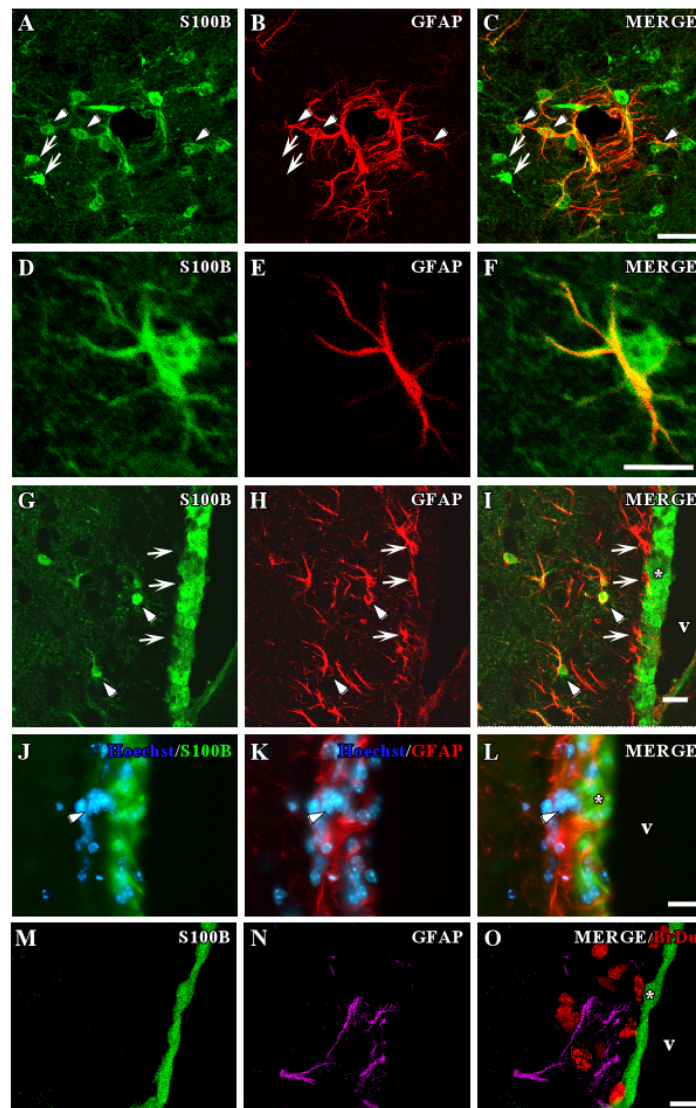
Comme je l'ai dit précédemment, la formation d'oligodendrocytes dans le télencéphale résulte de différentes phases de transformations cellulaires au sein du lignage oligodendrocytaire. Les cellules progénitrices oligodendrogiales (OPC), chez la souris, se caractérisent notamment par des marqueurs de surface que sont NG2 et le récepteur alpha du PDGF. Au cours du développement post-natal, elles vont progressivement se différencier en pro-oligodendrocytes puis en pré-oligodendrocytes pour finalement devenir des oligodendrocytes matures et myélinisants. Cette transformation, tout au long du lignage oligodendrocytaire, est considérée comme une maturation cellulaire.

De façon tout à fait intéressante, la fonction des OPCs périnatales a été élargie puisqu'il semblerait que certaines cellules NG2 possèdent des propriétés multipotentes *in vitro* et *in vivo* (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). De nombreuses OPC périnatales ne se différencient pas au cours du développement et persistent ensuite chez l'adulte où elles représentent 5-8% de toute la population gliale. Toutefois, elles diffèrent de leurs homologues périnatales car elles se différencient, *in vivo*, exclusivement en oligodendrocytes (Windrem et al., 2004). Cependant, il n'existe actuellement aucun marqueur capable de discriminer les OPC multipotentes des OPC irréversiblement engagées dans une voie de différenciation oligodendrocytaire.

Dans cette première partie de thèse, nous avons cherché à déterminer l'expression spatio-temporelle et la fonction de la calcioprotéine S100B dans la lignée oligodendrocytaire. Partant de l'hypothèse que l'expression de la S100B dans les cellules gliales pourrait refléter des différences de maturation cellulaire, nous avons comparé, *in vitro*, l'expression de la S100B dans les OPC multipotentes ou induites dans leur différenciation. Enfin, utilisant une lignée de souris invalidées pour le gène *s100b*, nous avons finalement abordé la fonction de cette protéine dans la maturation oligodendrocytaire *in vitro* et *in vivo*.

Supplementary figure 1

Deloulme et al.



Microscopy analysis of S100B and GFAP immunoreactivities in the adult mouse brain.

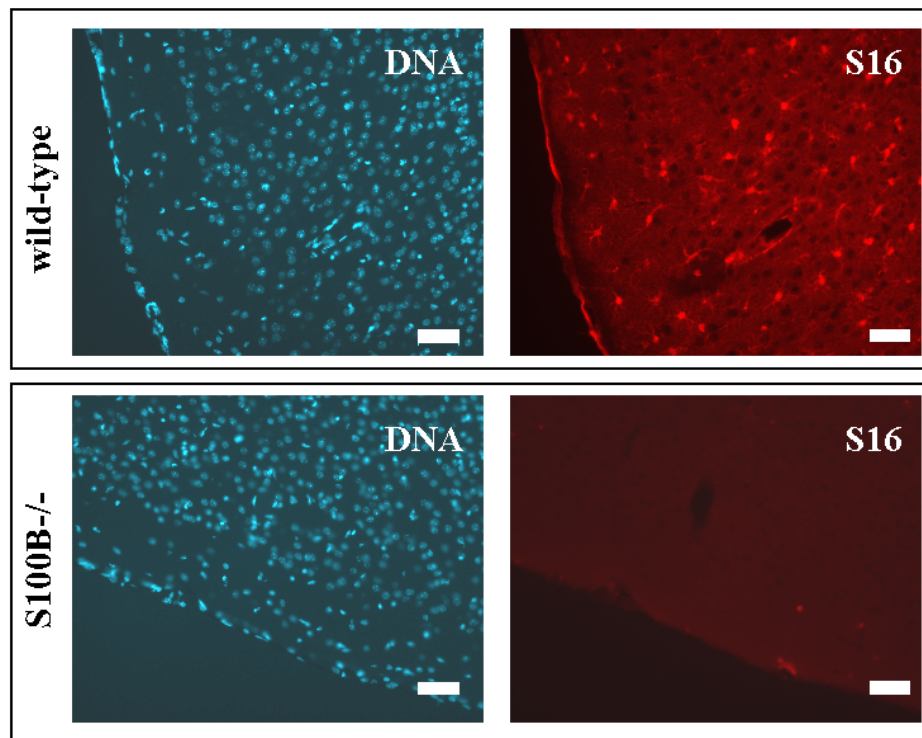
A-C: In the brain parenchyma, astrocytes surrounding brain capillaries are co-immunostained with S100B and GFAP. Arrowhead point to S100B⁺/GFAP⁺ astrocytes whereas arrows indicated S100B⁺/GFAP⁻ cells that most likely correspond to adult OPC.

D-F: Confocal analysis of GFAP⁺/S100B⁺ astrocyte shows both cytoplasmic and nuclear S100B immunostaining. The nucleoli are totally devoid of S100B immunoreactivity.

G-I: Low magnification observation of the lateral ventricle reveals intense S100B immunoreactivity in lining ependymal cells. The SVZ astrocytes (GFAP⁺) are not S100B⁺ (arrows and also J-O), whereas those located deeper in the brain parenchyma are co-immunostained (arrowheads).

J-O: High magnification observations of the S100B and GFAP immunoreactivities in the germinative SVZ of the lateral ventricle. J-L; S100B is not present in the SVZ astrocytes (GFAP⁺) that surround cluster of precursor cells (arrowhead). M-O: GFAP⁺/S100B⁻ astrocytes surrounding dividing precursor cells BrdU⁺ of the SVZ are not immunostained with S100B. Mice were injected with BrdU for 2h prior to fixation. Sections were triple immunostained with mouse anti-S100B (green), rabbit anti-GFAP (blue), ant rat anti-BrdU (red) that reveals dividing neuroblast cells. In I, L and O, v and * indicated ventricle and ependymal cells lining ventricle respectively. All immunostaining preparations have been analyzed by confocal microscopy excepted in J-L. Scale bar = 20µm.

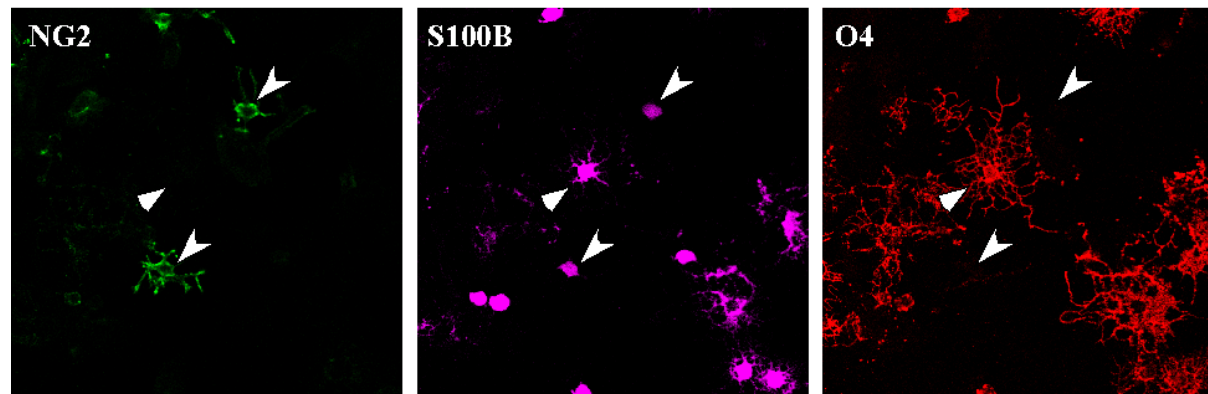
Supplementary figure 2



Specificity of immunofluorescence staining given by the mouse monoclonal S16 antibody.

Sagittal sections of mouse cerebral cortex derived from wild type mice (wild-type) or S100B null mice (S100B $-/-$) were analysed by indirect immunofluorescence labelling using anti-S100B S16 monoclonal antibody (S16). The cell nuclei were counterstained with Hoechst (DNA). Bar: 50 μ M

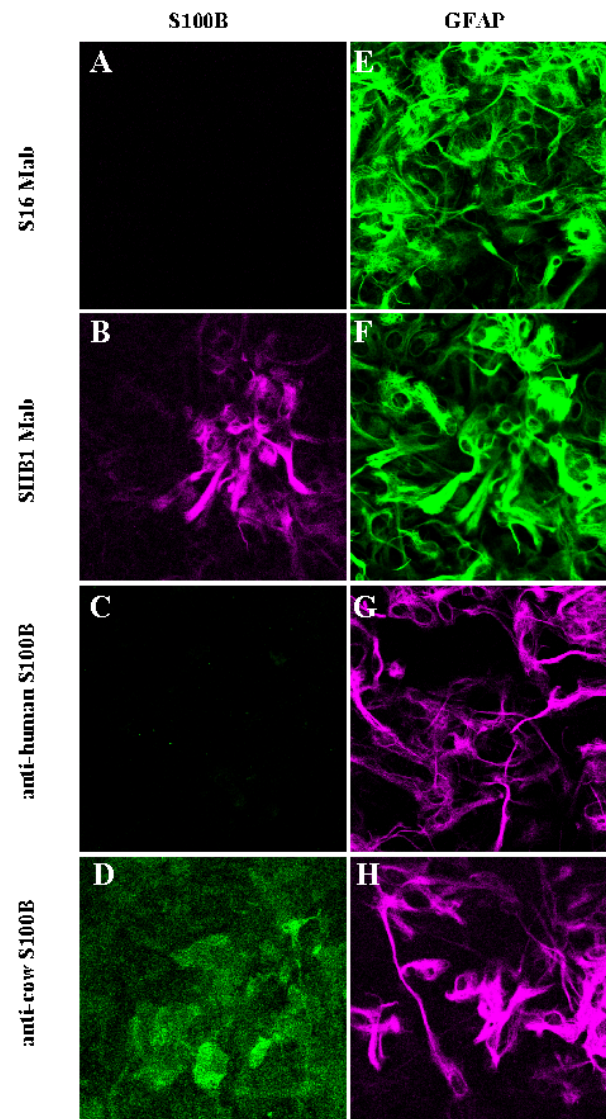
Supplementary figure 3



Characterization of S100B positive cells in primary glial cell culture from mouse spinal cord.

Three day-old primary mixed glial cell cultures from the spinal cords of E 16 mice were analyzed by triple immunofluorescence labelling with rabbit anti-NG2, mouse anti-S100B, and with the rat O4 glycolipid antigen. Arrowheads indicate oligodendroglial cells. Note that low S100B immunoreactivity was generally found associated with NG2 positive cells compared to pre-oligodendrocytes O4⁺.

Supplementary figure 4



Comparison of non-specific immunostaining between S100B antibodies.

30 day old primary glial cell cultures derived from newborn S100B^{-/-} mice brain were fixed and double-immunolabeled with anti S100B (A-D) and anti GFAP (E-H) antibodies. A: Mouse monoclonal S16 (1:1000); B: Mouse monoclonal SHB1 from Sigma (1:500); C: Rabbit polyclonal anti human S100B from DAKO (1:500); D: Rabbit polyclonal anti cow S100B from DAKO (1:1000). E and F: Rabbit polyclonal anti cow-GFAP from DAKO (1:3000); G and H: Mouse monoclonal anti GFAP from Chemicon (1:1000). Anti rabbit Alex 488 is from Molecular probes (1:1000). Anti mouse Cy 5 is from Immuno Jackson (1:500).

6.1.2 Discussion

Dans cet article, nous avons étudié l'expression et le rôle de la protéine S100B au cours de la maturation des cellules progénitrices oligodendrogiales (OPC) en oligodendrocytes. Pour cela nous avons développé des techniques, *in vitro*, de culture cellulaire et de neurosphères ainsi que des approches, *in vivo*, via des études immunohistochimiques et un modèle de démyélinisation induit par cuprizone.

6.1.2.1 S100B, cellules gliales oligodendrocytaires et maturation

Au travers de cette étude, nous avons démontré que chez la souris, en plus de marquer les astrocytes, la S100B s'exprime aussi dans les cellules gliales de la lignée oligodendrocytaire. C'est après la naissance, au cours de la maturation des OPC en oligodendrocytes, qu'une drastique augmentation de la proportion d'OPC exprimant, *in vivo*, la protéine S100B est observée. Cependant, l'expression de la S100B dans cette lignée cellulaire ne se limite pas uniquement aux OPC.

Ainsi, les cellules NG2 commencent à exprimer, au fur et à mesure du développement post-natal, la protéine S100B. Au cours de leur transformation en pro-oligodendrocytes O4⁺, en pré-oligodendrocytes MBP⁺ puis en oligodendrocyte non myélinisant Rip⁺, elles conservent l'expression de cette calcioprotéine. Finalement, lorsque ces cellules deviennent fonctionnellement matures avec la myélinisation des axones, elles répriment l'expression de la protéine S100B. Ces observations suggèrent une corrélation entre l'expression de la protéine S100B dans les OPC et leur entrée dans la maturation oligodendrogliale. Cette hypothèse a été confortée par nos cultures, où les OPC à morphologie immature (peu ou pas ramifiée) et proliférant rapidement sont dépourvues de S100B. En condition de maturation oligodendrocytaire, les OPC changent de morphologie, deviennent plus ramifiés et commencent alors à exprimer, de façon nucléaire, la protéine S100B. Ensuite les pro-oligodendrocytes O4⁺ et les pré-oligodendrocytes MBP⁺ l'expriment beaucoup plus fortement. Ceci confirme que l'apparition de cette protéine dans la lignée gliale oligodendrocytaire est corrélée à la maturation des OPC en oligodendrocytes.

Chez l'adulte, les OPC persistantes sont unipotentes et ne peuvent générer que des oligodendrocytes lorsqu'elles sont réimplantées, *in vivo* (Windrem et al., 2004). Concernant les potentialités de différenciation, elles sont donc déjà plus engagées dans la maturation oligodendrocytaire que leurs homologues périnatales, qui elles, peuvent être bi- ou multipotentes (Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Belachew et al., 2003). De façon intéressante nous avons, là aussi, observé que la majorité de ces OPC chez l'adulte expriment la protéine S100B. Ces résultats confortent l'idée que l'apparition de la S100B dans les OPC témoigne de leur restriction dans le lignage oligodendrocytaire et donc d'une maturation gliale.

La preuve du rôle de la protéine S100B dans la maturation des OPC dans la voie oligodendrocytaire provient de nos expériences, *in vitro* et *in vivo*, réalisées à partir d'animaux invalidés pour le gène *s100b* (Xiong et al., 2000). *In vitro*, nous avons ainsi pu démontrer que la maturation des oligodendrocytes est altérée aussi bien à partir d'OPC provenant de culture primaire qu'à partir d'OPC provenant de cultures issues de neurosphères d'animaux S100B^{-/-}. En outre, dans des conditions pathologiques de démyélinisation, via le modèle cuprizone, nous avons observé un retard, *in vivo*, dans la maturation des OPC avec une accumulation des cellules NG2⁺ chez les animaux S100B^{-/-}. Ces résultats placent la protéine S100B comme un acteur moléculaire impliqué dans la régulation de la maturation des OPC en oligodendrocytes matures.

6.1.2.2 Les OPC S100B⁺ : encore des cellules progénitrices ?

Nos résultats suggèrent qu'une cellule oligodendrocytaire exprimant la protéine S100B est une cellule restreinte dans son lignage. Si ces observations lient l'apparition de la S100B dans ces cellules gliales avec des états de maturation avancés, ceci n'exclut pas le fait que ces cellules puissent conserver des propriétés de progéniteurs, c'est-à-dire de cellules proliférantes. En effet, si les OPC adultes sont S100B⁺ et donc probablement plus mature que leur homologue périnatale, elles sont toujours capables de proliférer, *in vivo*. Ainsi, dans nos expériences, en conditions physiologiques, toutes les cellules proliférantes NG2⁺ adultes expriment la protéine S100B. Or *in vitro*, la majorité des cellules ayant incorporé le BrdU (marqueur de cellules réalisant une synthèse d'ADN) ne sont pas S100B⁺. Ce

paradoxe peut simplement s'expliquer par le fait que les OPC obtenus proviennent de culture de nouveaux-nés et non d'adultes. En culture, les OPC proliférant S100B⁻ peuvent se différencier en astrocytes de type 2 (donc ne sont pas unipotentes), prolifèrent rapidement et ont une morphologie immature (peu ramifiée), ce qui les distingue des OPC adultes. Le traitement des cultures par les facteurs de croissance PDGF et bFGF permet la prolifération rapide et l'amplification des OPC tout en bloquant leur maturation. Dans ces conditions expérimentales, les OPC immatures S100B⁻ répondent fortement aux facteurs de croissance et s'amplifient rapidement, ce qui est visualisé par une diminution du messenger codant pour la protéine S100B dans nos cultures. Néanmoins, nous avons aussi observé que les OPC S100B⁺ peuvent proliférer, *in vitro*, mais comme leur cycle cellulaire est plus long, elles s'amplifient beaucoup plus lentement et ne représentent que 10-15% des OPC proliférants. La présence de S100B dans les cellules gliales est donc certes liée à leur maturation mais pas forcément à leur différenciation terminale.

6.1.2.3 Les souris transgéniques *s100b*-EGFP et le lignage oligodendrocytaire

Récemment, une lignée de souris transgéniques permettant la visualisation directe des cellules S100B positives a été générée (Vives et al., 2003). Cette lignée utilise un gène rapporteur EGFP sous les séquences promotrices du gène *s100b* murin. La séquence du gène murin utilisée (-1669/+3116) inclut le premier exon et le premier intron. Le profil d'expression spatio-temporel du gène rapporteur et de la protéine S100B endogène a été réalisé et démontre une forte homologie, *in vivo* (Vives et al., 2003).

Utilisant cette souris, l'équipe du Dr. Catherine Legraverend a aussi pu démontrer que les cellules de la lignée oligodendrocytaire expriment à la fois la protéine S100B et le transgène EGFP (Vives et al., 2003). Des études plus poussées par la suite, ont spécifiquement étudié le profil d'expression spatio-temporel de la S100B dans ce lignage oligodendrocytaire en utilisant cette lignée de souris transgéniques (Hachem et al., 2005). Les observations réalisées dans cette étude ont totalement confirmé nos résultats précédents.

6.1.2.4 Apparition de la S100B dans les oligodendrocytes et les astrocytes.

Nos résultats *in vivo* et *in vitro* mettent en évidence que la protéine S100B semble beaucoup plus précoce dans le lignage oligodendrogial qu'astroglial. En effet, au cours de la première semaine de développement post-natal, la majorité des cellules S100B⁺ appartiennent au lignage oligodendrocytaire alors que les astrocytes GFAP⁺ du corps calleux n'expriment peu ou pas cette protéine. La S100B apparaîtra plus tardivement dans les astrocytes pour se généraliser au 15^{ème} jour post-natal. Ces observations suggèrent là aussi que la protéine S100B pourrait être liée à la maturation des autres cellules gliales que sont les astrocytes. De plus, ces résultats ont été étayés *in vitro*, où les cellules astrocytaires produites à partir de neurosphères expriment la S100B tardivement et bien après les cellules de la lignée oligodendrogiale. Une étude plus détaillée de la protéine S100B dans la lignée astrocytaire sera présentée dans l'article N°2.

6.1.2.5 Compensations des fonctions de la protéine S100B par son homologue S100A1 ?

La protéine S100A1 a été très peu étudiée dans le SNC. Ceci est principalement dû à l'absence d'anticorps spécifiques ainsi qu'à sa faible expression dans le cerveau de bœuf ou de rat (espèces où les premières études ont été faites). Néanmoins, une expression dans certaines populations neuronales et astrocytaires a tout de même été décrite (Isobe et al., 1984; Kahn et al., 1997).

La calcioprotéine S100A1 possède une séquence primaire très proche de celle de la S100B. De plus, ces deux protéines peuvent s'hétérodimériser et possèdent des localisations subcellulaires identiques, *in vitro*. Ces données suggèrent une possible compensation de certaines fonctions cellulaires de la S100B par la protéine S100A1.

6.2 Etude de l'expression de la calprotectine S100A1 dans la lignée oligodendrogliale du télencéphale

Nous avons observé que la protéine S100B s'exprimait fortement dans la lignée oligodendrogliale. Toutefois, son invalidation génique ne conduit pas à un phénotype majeur dans le développement de ces cellules, ce qui suggère une possible compensation fonctionnelle par d'autres protéines S100 structurellement proches. La calprotectine S100A1 étant la plus proche de la S100B, dans cette partie de la thèse, nous nous sommes attachés à déterminer son profil d'expression dans la lignée gliale oligodendrocytaire.

Si cette protéine S100A1 était considérée comme s'exprimant faiblement dans certains astrocytes immatures et dans des neurones du SNC, aucune étude de son expression spatio-temporelle dans les différents types cellulaires du SNC, n'avait été réalisée au commencement de cette thèse. Ainsi, il était impossible de dire si cette protéine pouvait s'exprimer ou non dans la lignée oligodendrocytaire. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps déterminé *in vitro* et *in vivo* l'expression de cette protéine dans ce lignage oligodendrocytaire.

6.2.1 Etude *in vivo*

L'expression de la calprotectine S100A1 débute faiblement dans le télencéphale dans les périodes précoces de la gliogenèse, c'est-à-dire dès E14.5. Sa localisation est tout d'abord strictement restreinte à la zone ventriculaire (VZ) latérale (future région striatale). A E16.5, la protéine S100A1 reste localisée majoritairement dans la VZ (dans les cellules de la glie radiale, voir article N°2), cependant des cellules éparses apparaissent dans le parenchyme. Ces cellules expriment le marqueur AN2 ou le récepteur alpha du PDGF et donc présentent les caractéristiques d'OPC (Figure 2 et données supplémentaires N°2 de l'article N°2). De façon intéressante, tous les OPC S100A1⁺ n'expriment pas forcément l'isoforme S100B (Figure 16A). Nous avons démontré précédemment que l'apparition de la S100B dans les OPC correspondait à la restriction d'une cellule OPC bi- ou multipotente vers une cellule OPC unipotente ne générant que des cellules de la lignée oligodendrogliale (article N°1). Ces résultats développementaux suggèrent que l'expression de la S100A1

dans les OPC est extrêmement précoce et n'est pas liée qu'à un phénomène de maturation.

Au cours de l'oligodendrogenèse post-natale, l'isoforme S100A1, comme S100B, reste exprimé tout au long de cette maturation gliale de l'OPC AN2⁺ à l'oligodendrocyte MBP⁺. Cependant, lorsque les oligodendrocytes entament sa dernière phase de maturation en réalisant de contacts axonaux afin de les myéliniser, les oligodendrocytes arrêtent d'exprimer l'isoforme S100A1 tout en conservant la S100B (Figure 16B et C). Ensuite, lorsque les oligodendrocytes deviennent matures myélinisants RIP⁺, l'expression de la S100B disparaît de ces cellules comme pour la S100A1 (Figure 16D et E).

Ces résultats du développement de la lignée oligodendrogliale dans le télencéphale de souris, démontrent que le patron d'expression des isoformes S100A1 et S100B est extrêmement proche dans ces cellules. Ceci suggère une possible fonction compensatoire des fonctions de la protéine S100B par la S100A1, dans les souris invalidées pour le gène *s100b* au cours de la maturation.

Cependant, nous avons observé que, contrairement à la S100B, l'expression de la S100A1 dans les OPC était plus précoce et ne semblait pas être uniquement liée à leur maturation. Afin de vérifier ces données, nous avons ensuite réalisé des expériences à partir de culture primaires puis secondaire d'oligodendrocytes.

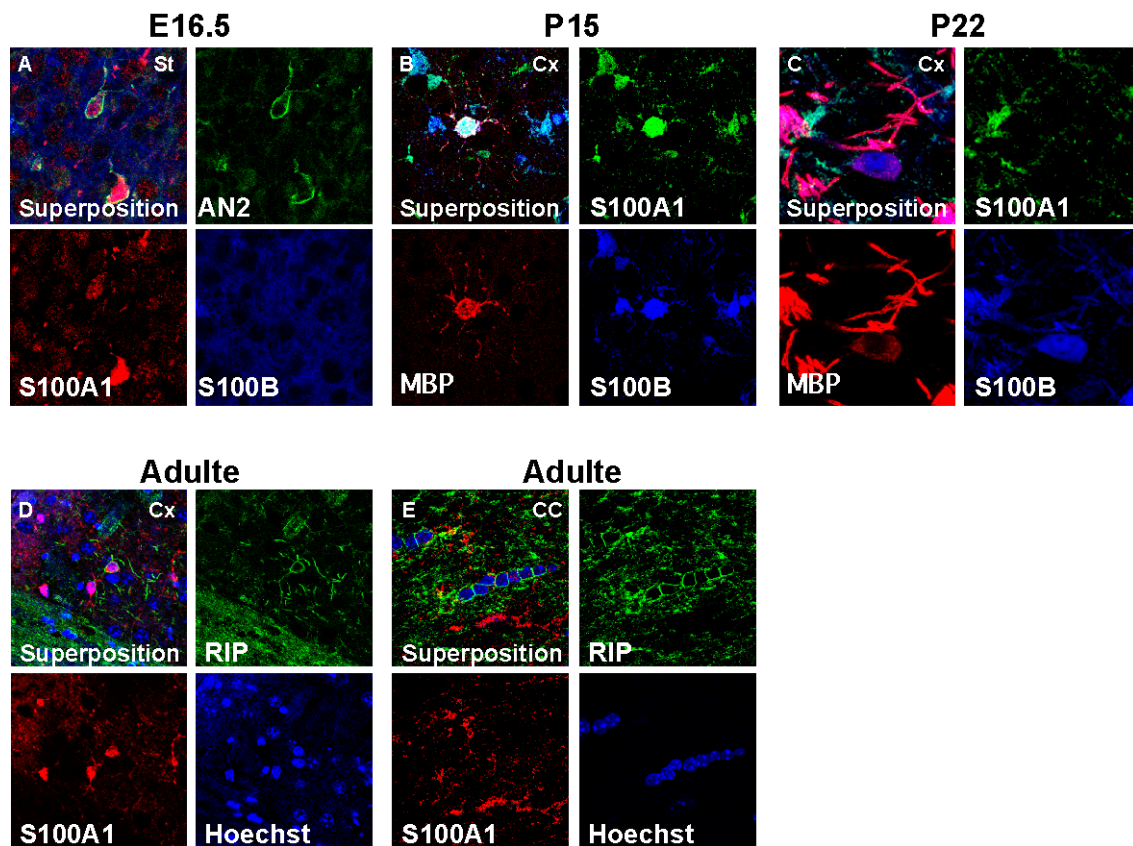


Figure 16 : Expression de la protéine S100A1 dans le lignage oligodendrocytaire de l'embryon à l'adulte.

(A), au cours du développement embryonnaire, la S100A1 s'exprime beaucoup plus précocement que la protéine S100B dans les cellules progénitrices oligodendrogiales. (B), pendant les phases de maturation oligodendrocytaire, les protéines S100A1 et S100B sont co-exprimées jusque dans les oligodendrocytes en voie de myélinisation. (C), cependant, les oligodendrocytes établissant des contacts avec les axones et débutant la myélinisation perdent l'expression de la protéine S100A1 tout en continuant à exprimer la protéine S100B. Chez l'adulte, les oligodendrocytes néo-formés et peu ramifiés expriment encore la protéine S100A1 (D) alors que les oligodendrocytes fonctionnels ne l'expriment plus (E).
 Abréviations : St, *striatum* ; Cx, *cortex* ; CC, *corps calleux*.

6.2.2 Etude *in vitro*

Nous avons souhaité confirmer nos résultats obtenus *in vivo*, en réalisant des cultures issues de nouveaux nés. Ainsi, nous avons pu observer que la S100A1 s'exprimait aussi, *in vitro*, dans toutes les cellules de la lignée oligodendrogiales de l'OPC (A2B5⁺) aux oligodendrocyte (MBP⁺) en passant par le pré-oligodendrocytes (O4⁺). La S100A1 est présente de façon nucléaire dans les OPC immatures non ramifiés et les pro-oligodendrocytes peu ramifiés (Figure 17A-C tête de flèches) puis se distribue de façon nucléaire et cytoplasmique dans les pré-oligodendrocytes et les oligodendrocytes possédant de nombreuses extensions cellulaires (Figure 17C flèches).

L'expression continue de la S100A1, de l'OPC à l'oligodendrocyte, suggère que la régulation de son expression ne dépend pas de la maturation de ces cellules. Afin de valider cette hypothèse, nous avons quantifié le taux de messenger codant pour la S100A1 et la S100B au cours de la maturation des OPC en oligodendrocytes. Pour cela nous cultivons les cellules en absence de facteurs de croissance dans le milieu de culture (voir article N°1). Comme attendu, le taux de messenger codant pour la S100B augmente fortement après 48 heures en milieu de différenciation. A l'inverse, le taux de messenger S100A1 ne varie absolument pas au cours de la maturation de ces cellules gliales (Figure 17D). Ceci confirme que la régulation de l'expression de cette protéine est indépendante de l'état de maturation de ces cellules gliales. De ce fait, lors d'un co-marquage S100A1-S100B, de nombreuses cellules à morphologie immature expriment l'isoforme S100A1 mais pas S100B (Figure 17E tête de flèches), alors que certaines cellules S100A1 commencent à exprimer légèrement la protéine S100B (Figure 17E, flèches). Cependant, au cours de cette maturation, toutes les cellules O4⁺ (Figure 17E) puis MBP (non illustré) expriment les deux isoformes avec une co-localisation parfaite (figure 17E). Cette observation démontre qu'au cours de la maturation, les deux protéines sont exprimées dans le même type cellulaire et possèdent les mêmes localisations sub-cellulaires.

Ces résultats démontrent pour la première fois que la calcioprotéine S100A1 peut aussi s'exprimer, *in vitro* et *in vivo*, dans les cellules gliales de la lignée oligodendrocytaire à des stades très précoces. Ils suggèrent aussi un possible rôle

compensatoire des fonctions de la protéine S100B par la protéine S100A1, au cours de la maturation des OPC en oligodendrocytes.

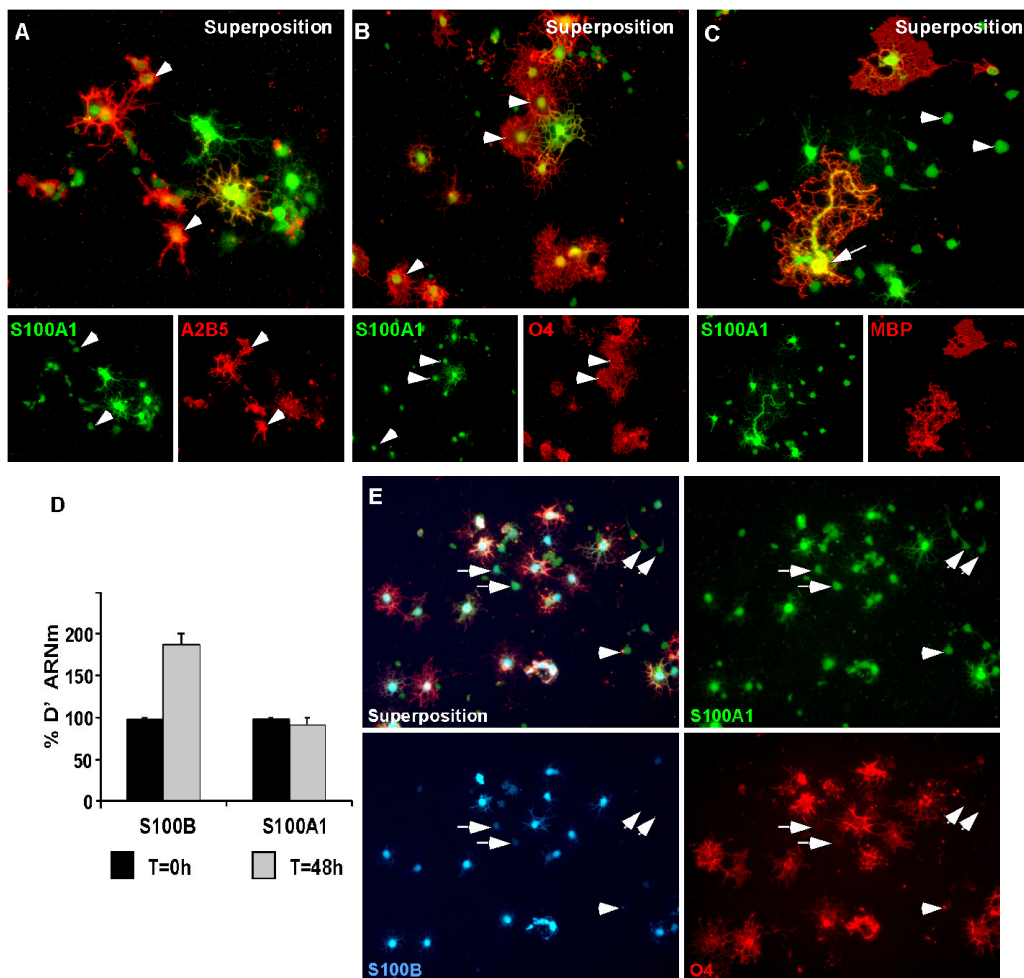


Figure 17: Expression de la protéine S100A1 au cours de la maturation oligodendrocytaire.

A- Expression de la S100A1 dans les OPC A2B5+. Toutes les OPC expriment cette protéine, cependant la S100A1 présente une localisation majoritairement nucléaire dans les OPC peu ramifiées (tête de flèches). **B-** Les pro et pré-oligodendrocytes O4+ continuent à exprimer la protéine S100A1 de façon nucléaire (tête de flèche) mais aussi nucléo-cytoplasmique au fur et à mesure de leur maturation phénotypique et morphologique. **C-** Les oligodendrocytes MBP+ expriment la protéine S100A1 de façon nucléo-cytoplasmique (flèche) les autres cellules MBP- l'expriment majoritairement de façon nucléaire (tête de flèche). **D-** Quantification des messagers codant pour la protéine S100A1 ou S100B en fonction de leur état de maturation. **E-** Coexpression et colocalisation subcellulaire des protéines S100A1 et S100B dans les pro et pré-oligodendrocytes O4+. Des OPC très immatures expriment déjà la S100A1 mais pas la S100B (tête de flèche) alors que les OPC (O4 négatifs) s'engageant dans la voie oligodendrocytaire commencent à exprimer légèrement la S100B (flèche).

6.3 Génération de souris doublement invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*

Dans cette partie de la thèse nous avons décidé d'étudier le possible rôle compensatoire de la S100A1 dans la maturation des cellules gliales en générant une lignée de souris doublement invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*.

Les souris S100A1^{-/-} ont été générées dans le laboratoire du Dr. Jörg Heierhorst (Du et al., 2002). Les souris S100A1^{-/-}, S100B^{-/-} et doublement invalidées sont génotypées par PCR. A la suite de leur croisement, les souris sont double hétérozygotes S100A1^{+/-} S100B^{+/-}; les croisements de ces doubles hétérozygotes génèrent des souris doublement invalidées avec une probabilité de 1/16^{ème}.

Les souris doublement invalidées ont été récemment obtenues au laboratoire (en fin d'année dernière). Elles sont parfaitement viables et aucun changement dans les proportions mendéliennes à la naissance, démontrant une létalité due à l'invalidation des gènes, n'a été observé.

L'étude sur ces souris est actuellement en cours, cependant aucun phénotype majeur dans des conditions physiologique n'a pu être mis en évidence, pour l'instant. Des études préliminaires par western blot ont confirmé la présence à des taux identiques des protéines GFAP, MBP ou NG2 chez l'adulte (Figure 18). Nous avons aussi étudié chez l'adulte par immunohistochimie, la morphologie et le nombre d'astrocytes, la prolifération cellulaire et la neurogenèse adulte (Figure 19 et données non illustrées) ainsi que le nombre et la morphologie d'OPC adultes et d'oligodendrocytes myélinisants (Figure 20 et données non illustrées). Aucun de ces points n'a semblé altéré dans des conditions physiologiques chez l'adulte. En outre, les souris présentent un comportement général (sociabilité, agressivité, curiosité, comportement maternel) identique aux souris sauvages. Des études plus poussées, notamment en conditions pathologiques démyélinisantes sont également en cours. Des premiers résultats préliminaires suggèrent une réponse différente aux stress démyélinisants (cuprizone) entre les souris sauvages et doublement invalidées.

Cependant, les souris S100B^{-/-} ont été générées sous un fond génétique non co-sanguin (fond CD1). Ainsi, les souris doublement invalidées ne sont pas sous un fond génétique "pur", ce qui complique l'analyse statistique du nombre de cellules NG2, de cellules proliférantes ou la reproductibilité des expériences de démyélinisation. C'est pourquoi, il était indispensable de recroiser ces souris sous un

fond co-sanguin, tel C57BL6. Actuellement nous en sommes à la sixième génération, cependant, il faut une dizaine de génération pour obtenir une lignée sur un fond co-sanguin. Dès que ceci sera réalisé, les expériences pourront être refaites et confirmées ou infirmées. La mise sous un même fond génétique des souris doublement invalidées permettra une meilleure reproductibilité de tous les résultats.

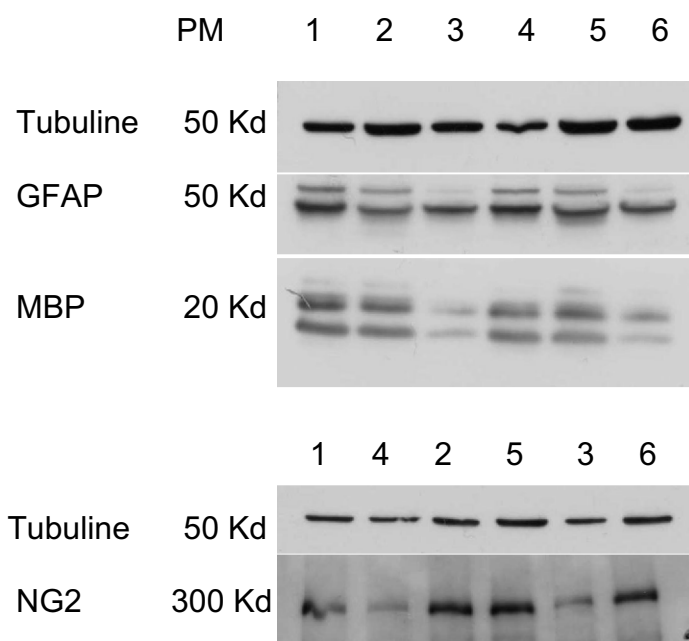


Figure 18 : Expression des protéines GFAP, MBP et NG2 dans des souris adultes sauvages ou invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*.

1- cervelet sauvage, 2- télencéphale sauvage, 3- bulbe olfactif sauvage, 4- cervelet invalidé, 5- télencéphale invalidé, 6- bulbe olfactif invalidé. *PM*, poids moléculaire ; *Kd*, Kilo Dalton ;

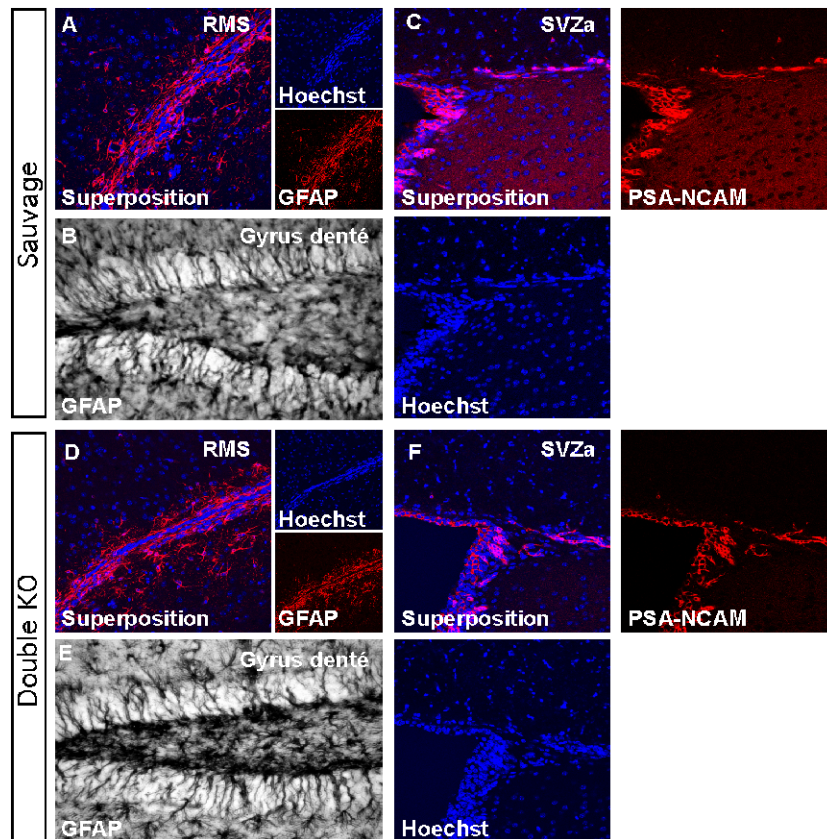


Figure 19 : Comparaison des astrocytes GFAP positifs et des neuroblastes PSA-NCAM positifs dans les zones germinatives adultes de souris sauvages ou invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*.

Astrocytes formant les gaines de migration des neuroblastes chez des souris sauvages (A) ou doublement invalidées (D). Astrocytes dans le gyrus denté de l'hippocampe de souris sauvages (B) ou doublement invalidées (E). Etude des neuroblastes au niveau de la SVZ antérieure chez des souris sauvages (C) ou doublement invalidées (F). Aucune différence majeure n'a pu être observée chez les souris doublement invalidées. RMS : Rostral Migratory Stream ; SVZa : zone sous ventriculaire antérieure.

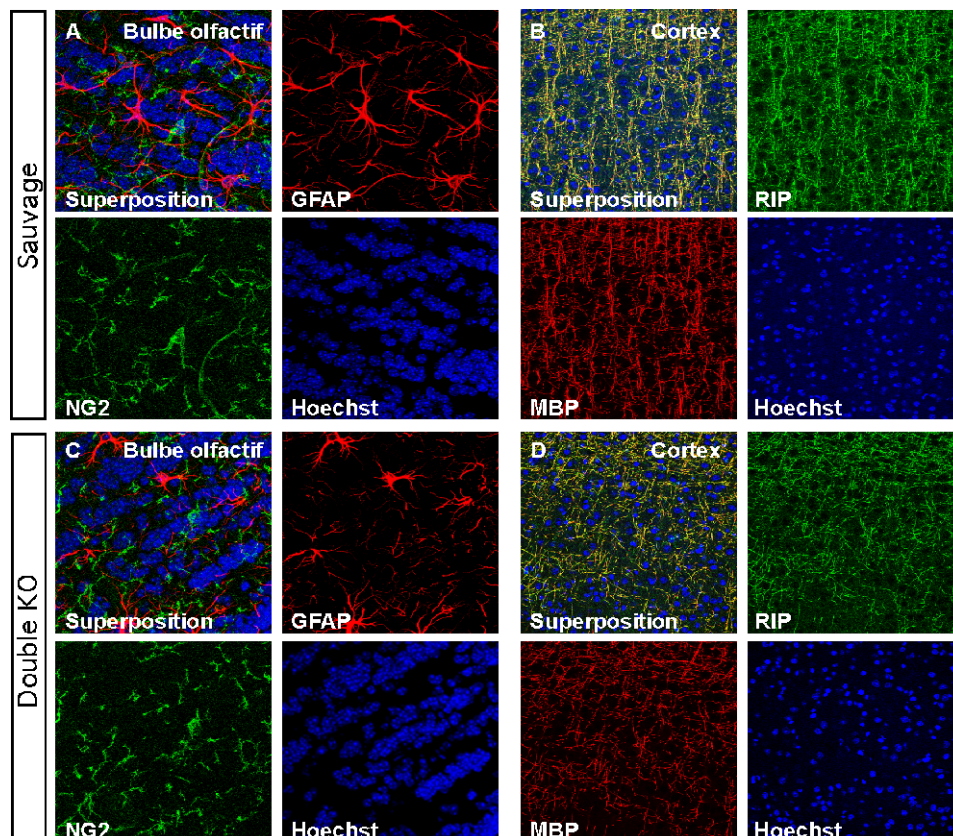


Figure 20 : Etude des cellules oligodendrocytaires adultes chez des souris sauvages ou doublement invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*.

Etude des progéniteurs d'oligodendrocytes (NG2) et des astrocytes dans le bulbe olfactif de souris adultes sauvages (A) ou doublement invalidées (C). Etude des axones corticaux myélinisés chez des souris sauvages (B) ou doublement invalidées (D). Actuellement, aucune différence majeure n'a pu être observée chez les souris doublement invalidées.

7 Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des astrocytes de la zone sous ventriculaire adulte

7.1 Article N°2 : L'EGF préserve le potentiel de cellule souche neurale des astrocytes en les maintenant dans un stade de développement immature S100B négatif.

7.1.1 Introduction

Les résultats obtenus précédemment démontrent des différences dans la chronologie d'expression entre les isoformes S100A1 et S100B dans les cellules gliales de la lignée oligodendrocytaire. Ces observations montrent que la S100A1 est un marqueur très précoce dans le lignage glial alors que la S100B apparaît plus tardivement. En outre, des notions de prolifération et de potentialité de différenciation cellulaires sont à associer à ces différents marqueurs. Ainsi, une cellule progénitrice oligodendrogliale S100A1⁺ S100B⁻ est une cellule capable de proliférer rapidement et de se différencier en plusieurs types cellulaires. Alors qu'une cellule progénitrice oligodendrogliale S100A1⁺ S100B⁺ est plus avancée dans sa maturation avec un cycle cellulaire plus lent et une capacité de différenciation restreinte uniquement à la voie oligodendrogliale.

Ces résultats sont très intéressants, car ces deux isoformes ont aussi été démontrées comme s'exprimant dans d'autres cellules gliales que sont les astrocytes (Donato, 2001; Isobe et al., 1981; Isobe et al., 1984; Kahn et al., 1997). Les astrocytes peuvent eux-aussi posséder des propriétés de cellules précurseurs du SNC. Si ces résultats peuvent aussi être étendus à ces cellules gliales, ces isoformes deviendraient des outils très intéressants pour caractériser différents stades de maturation des cellules gliales corrélés avec des potentialités de différenciation plus ou moins restreintes.

Dans le SNC adulte, deux zones germinatives persistent chez l'adulte, la zone sous ventriculaire (SVZ) et la zone sous granulaire (SGL) de l'hippocampe. Ces deux zones sont principalement dédiées à la neurogenèse adulte. Au niveau de l'hippocampe, les nouveaux neurones sont attribués à des fonctions d'apprentissage et de mémorisation (Gage, 2000; Gage et al., 1998). Au niveau de la SVZ, les

neuroblastes migrent vers le bulbe olfactif où ils se différencient en neurones GABAergique ou Dopaminergiques et sont notamment associés à des fonctions olfactives (Galli et al., 2003). Ces zones germinatives chez l'adulte, sont l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique. Ceci est lié au fait que ces zones contiennent des cellules aux capacités thérapeutiques extrêmement prometteuses : les cellules souches adultes. La cellule souche adulte se définit par des critères précis regroupant l'auto-renouvellement illimité et la différenciation multiple au sein du tissu adulte dont elle est issue (voir discussion rédigée de cet article). Dans les zones germinatives adultes, les cellules correspondants à ces critères possèdent les caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales de cellules gliales astrocytaires (Doetsch et al., 1997; Filippov et al., 2003; Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001). Ces observations sont troublantes, notamment parce qu'elle vont à l'encontre de l'idée même que nous nous faisons d'une cellule souche. En effet, si l'on devait qualifier les cellules souches, c'est plutôt les termes de cellules rares et indifférenciées qui nous viendraient le plus souvent à l'esprit (Spradling et al., 2001). Or, dans le cerveau adulte, ce sont des cellules avec des caractéristiques de cellules différenciées et très nombreuses, qui présentent ces propriétés. Pour réconcilier ces observations paradoxales avec la conception consensuelle qu'ont les scientifiques des cellules souches, certaines équipes de recherches ont émis l'hypothèse que, bien qu'exprimant la GFAP, ces cellules devaient être dans un certain état d'immaturité non caractérisé (Garcia et al., 2004; Laywell et al., 2000). De ce fait, la découverte de nouveaux marqueurs permettant de mieux caractériser les astrocytes, notamment en discriminant ceux des zones germinatives de ceux du parenchyme, devenait primordial.

Dans cette partie de la thèse, nous voulions déterminer si d'une part les isoformes S100A1 et S100B nous permettait de discriminer les astrocytes du parenchyme des astrocytes des zones germinatives. Le cas échéant, nous voulions, d'autre part, comprendre la signification de ces différences phénotypiques. Notamment, si elles pouvaient refléter des variations dans l'état de maturation et de potentialité de différenciation de ces astrocytes.

Nous avons pu mettre en évidence que si les astrocytes du parenchyme exprimaient les deux isoformes, ceux des zones germinatives n'exprimaient que la S100A1. Au travers de nos études développementales, nous avons ainsi déterminé

que la S100B était un marqueur tardif de la voie astrocytaire, bien après la GFAP. De plus, nos études *in vitro* démontrent que les astrocytes de la SVZ sont intrinsèquement capables de devenir S100B⁺. Ces observations suggèrent que des signaux environnementaux maintiennent les astrocytes GFAP⁺ de la SVZ adulte, dans un état immature puisqu'ils n'expriment pas la S100B, *in vivo*. Afin de déterminer l'importance de ce maintien pour la réalisation de leur fonction de cellules souches neurales, nous avons décidé de comparer les potentialités d'auto-renouvellement et de différenciation des astrocytes S100B⁻ et S100B⁺. Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé une souris transgénique exprimant une protéine fluorescente EGFP sous les séquences promotrices du gène *s100b* (Vives et al., 2003). Ensuite, après avoir réalisé des cultures astrocytaires, nous avons dissocié les cellules puis trié par FACS et placé celles-ci en conditions de neurosphères. Le système de neurosphères est le meilleur modèle cellulaire actuel pour tester les capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation des cellules, donc des propriétés de cellules souches. Nous avons pu démontrer que le maintien dans un état S100B⁻ est essentiel pour que les astrocytes conservent leurs propriétés germinatives. Sinon, ces cellules perdent de façon irréversible leur propriété de cellules souches neurales. Enfin, nous avons recherché quel signal environnemental pouvait participer au maintien de cette immaturité astrocytaire. Nous avons ainsi identifié, *in vitro* et *in vivo*, l'EGF comme étant un acteur environnemental important dans le contrôle du développement astrocytaire, suggérant que la signalisation EGF dépendante contribue au maintien des cellules souches astrogiales dans les zones germinatives du télencéphale adulte.

7.1.2 Article

EGF preserves neural stem cell potential of astrocytes by maintaining them in a S100B⁻ immature developmental stage.

Abbreviated title: EGF controls astrocytic NSC development

Eric Raponi,¹ Fabien Agenes,² Monique Miehé,³ Guy Roussel,³ Christian Delphin,¹ Jacques Baudier,¹ Catherine Legraverend,⁴ and Jean-Christophe Deloulme^{1&}

¹Laboratoire de Transduction du Signal, INSERM EMI-0104, DRDC CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 09, France ²Laboratoire d'Immunocytochimie, INSERM U548, DRDC CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 09, France. ³Physiopathologie du système nerveux, INSERM U575, Centre de Neurochimie, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France ⁴Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) Département Oncologie Cellulaire et Moléculaire, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France.

Corresponding author: [&]Laboratoire de Transduction du Signal /INSERM EMI 0104/DRDC, CEA Grenoble. 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France
Tel: (33)4 38 78 52 86; FAX: (33)4 38 78 50 58
e-mail: jcdeloulme@cea.fr

Number of figures: 8

Number of pages: 29

Keywords: neural stem cells, astrocytes, S100 proteins, SVZ, GFAP, maturation.

Acknowledgements:

We thank N. Assard, N. Bertacchi and A. Schweitzer for excellent technical assistance; N. Chaumontel, and S. Fremy for animal care; A. Depaulis for stereotaxic expertise, V. Collin and D. Grunwald from DRDC for assistance in Moflo sorting, and confocal scanning microscopy, respectively; J. Ciesielski-Treska; A. Faissner, T Seki and M. Takahashi for the gift of anti-vimentin, anti-Tenascin-C, anti-PSA-NCAM and S16 antibodies, respectively; the antibody against RC2 has been obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa DSHB); We gratefully thank C. Benaud and G. Labourdette for their critical reading and writing of the manuscript. E.R. obtained a CEA fellowship. The authors declare that they have no competing financial interests.

Summary

During the post-natal development, GFAP-expressing cells in the parenchyma progressively lose their neural stem cells (NSC) potential, whereas this peculiar attribute is preserved in astrocytes of adult subventricular zone. However, the regulatory factors involved in the maintenance of NSC potential by astrocytic cells remain largely elusive. Here, we identify S100A1 and S100B proteins as differential markers which define new developmental stages within the astrocytic lineage. We demonstrate *in vitro* and *in vivo* that S100A1 is precociously expressed in immature RC2⁺ astrocytic cells, whereas the onset of S100B expression characterizes a mature developmental stage, long after the loss of RC2 and the gain of GFAP. Using *s100b*-EGFP transgenic mice-derived culture models, we further demonstrate that, in our experimental conditions, the transition from an immature to a mature developmental stage is irreversible and result in the loss of their NSC potential. Furthermore, astrocytes grafting experiments reveal that the maintenance of astrocytes in an immature state strictly depends on subventricular environmental cues. Finally, we have identified the epidermal growth factor (EGF) as an extracellular component maintaining forebrain astrocytic cells in an S100B⁻ developmental stage, *in vitro* and *in vivo*, and increasing their NSC attributes, *in vitro*. Altogether, our findings provide evidences for a function of EGF in the control of astrocytic developmental program and raise the possibility of a general link between microenvironment and developmental stage in the maintenance of adult stem cell potential.

Introduction

In the adult mammalian forebrain, neurogenesis persists throughout life in only two main germinal zones: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricular wall, and the subgranular layer (SGL) of the dentate gyrus of the hippocampus (Palmer et al., 1999; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). The source of these new neurons is the adult neural stem cells (NSCs) (Gage, 2000). Stem cells are capable of unlimited self-renewal and multilineage differentiation and have been thought of traditionally as undifferentiated cells. However, this view has recently been challenged by the finding that, in the adult mammalian forebrain, the NSCs have phenotypical and ultrastructural characteristics of mature astrocytes (Doetsch et al., 1999; Seri et al., 2001; Filippov et al., 2003; Garcia et al., 2004).

Astroglial origin of NSCs is not surprising since recently radial glial cells, their embryonic homologue, have been demonstrated as assuming neurogenic and gliogenic functions during the forebrain development (Levitt and Rakic, 1980; Voigt, 1989; Noctor et al., 2001; Malatesta et al., 2003; Anthony et al., 2004). In post-natal stage, radial glia-derived cells in the parenchyma progressively lose their NSC attributes while transforming into GFAP⁺ astrocytes; whereas those in the future SVZ conserve their potentials and locally evolve into adult GFAP-expressing NSC (Laywell et al., 2000; Merkle et al., 2004). However, the factors involved in the maintenance of NSC potential by astrocytic cells remain largely elusive. It has been demonstrated that neurogenesis in adult SVZ is controlled by a dynamic balance between exposure to, and isolation from, differentiating cues present in their microenvironment (Tropepe et al., 1997; Lim et al., 2000; Garcion et al., 2001; Machold et al., 2003; Liu et al., 2005). However, this restricted environment might, among others, also control the developmental program of astrocytes. Therefore, it was hypothesized that NSC potential of the adult forebrain refers to biological function retained by certain GFAP⁺ astroglial cells which could be in an immature but unidentified developmental stage (Laywell et al., 2000; Steindler and Laywell, 2003; Garcia et al., 2004).

A critical, although often elusive, step in categorizing immature cells within a continuum of differentiation potential includes finding specific molecular markers. In the case of GFAP-expressing NSCs, the S100A1 and S100B calcioproteins appear as good candidates. In the adult forebrain, S100B can discriminate parenchymal astrocytes from those present in germinal zones (Filippov et al., 2003; Deloulme et

al., 2004). Moreover, S100A1, another structurally related, but less extensively studied brain protein, has also been detected in a subpopulation of immature astrocytes following injection of neonate rats with CNTF (Kahn et al., 1997). Here, we show that S100A1 defines an astrocytic lineage in which S100B is the latest marker, appearing long after GFAP and characteristic of the mature stages. Using *s100b*-EGFP transgenic mice (Vives et al., 2003), we demonstrate that astroglial cells remain immature and preserve their NSC potential as long as they are GFAP⁺S100A1⁺S100B⁻. Finally, we provide evidence for EGF being a microenvironmental factor which maintains astrocytic cells in an immature developmental stage and increases their NSC potential.

Our results show that the containment of astrocytic cells as NSC in adult germinal zones depends on the control of their developmental stage through microenvironmental signalling pathway.

Materials and Methods

Mice. *s100b*-EGFP (Vives et al., 2003) and β -actin-GFP transgenic mice (Okabe et al., 1997) were housed under standard laboratory conditions. C57/Bl6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Arbresle, France). Experiments were performed according to the principles of laboratory animal care in compliance with European and French law. Mouse embryos and newborn mice (E16-P15) were anesthetized by hypothermia and killed by decapitation.

Primary astrocytic cultures. Whole forebrains (hippocampus and fimbria excluded), lateral ventricular zone and cortex, were dissected out from P2 newborn mice. Tissues were dissociated by trypsinization and mechanical trituration in Hanks balanced saline solution containing 2.5 mg/ml trypsin (Invitrogen). Microglial cells were removed by preplating the cell suspension on non-coated Petri dishes for 15 min. The resulting cell suspension was then replated on non-coated Falcon Petri dishes in DMEM medium supplemented with 10% FBS. After 4 days *in vitro* (DIV), oligodendrocyte progenitor cells and neuroblasts growing on top of the developing astroglial layer, were selectively removed by flushing as previously described (Deloulme et al., 1990). Non-astrocytic cell contamination was evaluated using O4 antibody and antibodies directed against MBP, β -tubulin III and fibronectin, at DIV 15 and DIV 30. The percentage of non-astrocytic cells never exceeded 2.5% of the cells.

Immunohisto-, cytochemistry and electron microscopy. Cryostat brain tissue sections, whole-mounts of the lateral ventricles and cell preparations were fixed with 4% PFA as detailed previously (Deloulme et al., 2004). The following primary antibodies were used: mouse hybridoma supernatants RC2 (IgM, 1:10, Dev. Hybridoma Bank, University of Iowa) and O4. Rat monoclonal antibody (mAb) anti-GFAP (1:500, USB biological), mouse mAb anti-S100B (1:1500 (Takahashi et al., 1999), mouse mAb anti- β -tubulin III (1:1000, Berkley Ab company), mouse mAb anti-PSA-NCAM (1:500 (Seki and Arai, 1993), Guinea Pig polyclonal antibody (pAb) anti-GLAST (1:8000, Chemicon). Rabbit pAb anti-human S100B (1:700, DAKO Cytomation). Rabbit pAb anti- β -tubulin III (1:5000, Chemicon). The pAb anti-human S100A1 (DAKO Cytomation) was affinity-purified on human recombinant S100A1 protein-coupled sepharose beads and used at 0.01 μ g/ml. The specificity of anti-S100A1 and anti-S100B antibodies was routinely controlled on S100A1^{-/-} and S100B^{-/-} brain sections as previously described (Xiong et al., 2000; Du et al., 2002;

Deloulme et al., 2004). All sections and cell preparations were permeabilized and blocked in TBS containing 0.2% Triton X-100 and 5% normal goat serum (NGS) for 25 min. Embryonic tissue preparations including cryostat sections and lateral ventricle whole mounts were further treated with Mouse-on-Mouse blocking IgG reagent as described by the manufacturer (VectorShield). Finally, the primary antibody was applied overnight at 4°C followed by appropriate secondary antibodies conjugated with cyanin3, cyanin5 (Jackson immunoresearch Laboratories) or Alexa 488 (Molecular Probes Inc.), for 45 min. Nuclear counterstaining was performed with Hoechst 33258 (1 µg/ml). Fluorescent images were obtained with a Zeiss fluorescent microscope (Axiovert 200M) or with a Leica (TCS SP2) confocal microscope.

For electron microscopy, adult mice were perfused transcardially with 150 ml of 4% freshly depolymerized formaldehyde plus 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer pH 7.4 (PB). Brains were post-fixed for 1 h 30. The 70 µm vibratome coronal sections were incubated in a blocking solution of PBS containing 0.5% normal goat serum, 0.5% bovine serum albumin and 0.1% cold water fish skin gelatin for 1 hour at 4°C. Sections were then incubated overnight at 4°C with purified pAb anti-S100A1 diluted at 1:50 (Aurion, (Yi et al., 2001). After washing, sections were incubated overnight at 4°C in Ultra Small Immunogold F(ab')₂ fragment of goat antirabbit IgG (Aurion), the sections were then fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 hour and were silver enhanced using the R-Gent SE-EM (Aurion) for 1 hour. Sections were postfixed for 15 min in 0.5% OsO₄ in PB, submitted to dehydration in graded ethanol and propylene oxide, and flat-embedded in Araldite (Fluka). Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and observed with a Hitachi 7500 transmission electron microscope equipped with an AMT Hamamatsu digital camera.

Neurospheres from astrocytic cultures. 7, 15 or 30 DIV primary astrocytic cultures from whole forebrain, cortex and lateral ventricle SVZ, were prepared as described above. Astrocytic cells were dissociated by incubation at 37°C with cell dissociation reagent (Sigma, C5782) for 20 min at 37°C and then with trypsin at a final dilution of 1:100 (Gibco) for 2 min. Cells were gently triturated, pelleted for 5 min at 1000 rpm, resuspended in cell dissociation reagent, filtered through a 40 µm-mesh nylon cell strainer (Falcon). Dissociated cells were resuspended at a density of 5000 cells/ml in DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with B-27 complement (1:50, Invitrogen) and 10 ng/ml each of human EGF (Peprotech) and human bFGF. growth

factors were added every second day. In this model, only astrocytic cells and GFAP-expressing cells are able to generate primary neurospheres (Laywell et al., 2000; Imura et al., 2003). After 12 DIV, spheres were plated on PLL-coated coverslips and either counted or induced to differentiate for 4 days by growth factor withdrawal and addition of N2 and B27 complements (1:100 and 1:200, respectively, Invitrogen) and 3% FBS.

FACS Sorting. 15 and 30 DIV primary astrocytic cultures obtained from the forebrain of P2 newborn *s100b*-EGFP mice were prepared and dissociated as described above. Dissociated astrocytic cells were sorted using a MoFlo machine (Dako Cytomation). Electronic gates were defined using wild type and GFP astrocytic cultures derived from GFP transgenic mice (Okabe et al., 1997). EGFP-positive and negative cells sorted from *s100b*-EGFP brain tissue were counted and resuspended in neurosphere medium. Secondary astrocytic cultures were generated from sorted *s100b*-EGFP cells and treated every second day with 10 ng/ml of EGF.

Astrocytic cells transplantation. Astrocytic cultures derived from β -actin-GFP and *s100b*-EGFP mice were dissociated at 15 DIV and then injected stereotactically (1.10^4 cells/2 μ l) into the striatum or the SVZ of adult (8-week old) C57/Bl6 hosts at the following coordinates (mm) anteroposterior (AP), mediolateral (ML) and dorsoventral (DV) relative to Bregma AP/ML/DV: 0.6/2/-3 or 0.6/1.1/-3 respectively. After 3 weeks, brains were removed after intracardial perfusion of 4% PFA and stained as described above. In some experiments, grafted mice were given an i.v. injection of EGF (400 ng/40 μ l PB) every second day, for 4 weeks

Cell counts and statistics. Statistical analysis of the raw data was performed by analysis of variance followed by Student's t test using Excel software. The values are considered as significant when p is <0.05. The number of counted cells is indicated under brackets.

Results

Astrocytic cells of adult germinal zones express S100A1 but not S100B

When we analyzed the expression pattern of S100A1 and S100B in the adult mouse forebrain, we found that virtually all GFAP⁺ cells present in the fimbria, the corpus callosum, the striatum and the cortex express both S100B and S100A1 (n=521, Fig. 1A, arrows). However, the S100A1/B expression pattern was somewhat different within the adult GFAP⁺ cell populations of the dentate gyrus SGL and the SVZ of the lateral ventricles, two well-characterized germinal zones (GZ).

In the dentate gyrus (DG), primary precursors of neurons, with their soma aligned in the subgranular layer and polarized radial morphology, express the intermediate filament GFAP and nestin and are S100B⁻ (Seri et al., 2001; Filippov et al., 2003; Garcia et al., 2004). Interestingly, we found that these GFAP⁺S100B⁻ radial glial cells, express S100A1 (Fig. 1B, arrowheads). In contrast, non-germinal GFAP⁺ multipolar astrocytes within the DG hilus express both S100A1 and S100B (Fig. 1B arrows). In the adult SVZ where GFAP⁺ cells also assume the function of primary neural precursors (Doetsch et al., 1999; Garcia et al., 2004), S100B expression was also absent in these cells and was restricted to ependymal cells (Fig. 1C and C1) (Doetsch et al., 2002; Gregg and Weiss, 2003; Deloulme et al., 2004). In contrast, S100A1 expression was restricted to the subependymal GFAP⁺ cell compartment (Fig. 1D) enwrapping niches of proliferating BrdU-labeled cells (Fig. 1C-C1). These proliferating cells, likely correspond to the transit-amplifying progenitors and/or to the β -tubulin III⁺/PSA-NCAM⁺ migrating neuroblasts (Fig. 1E-F) (Doetsch et al., 1997). The restriction of S100A1 expression to the astrocytic cells in the SVZ has been confirmed by electron microscopy (Fig. 1G-G2).

Our results establish S100A1 as a new marker of all GFAP⁺ astrocytic cells present in the adult forebrain. Moreover, we show here that the lack of S100B expression in GFAP⁺S100A1⁺ astrocytic cells is a signature of germinal astrocytes.

Developmental patterns of S100A1 and S100B expression define new developmental stages in the astrocytic lineage

The existence of two GFAP⁺ astrocytic populations, one with neurogenic potential expressing only S100A1 and a non-neurogenic one expressing both S100A1 and S100B, raises questions about their ontogenic relationship.

Adult germinal SVZ astrocytes emanate from an evolution of radial glial cells lining the lateral ventricle starting at E15.5 (Anthony et al., 2004; Merkle et al., 2004). In contrast, the onset of RGC-derived neocortical astrogliogenesis (Levitt and Rakic, 1980; Voigt, 1989; Noctor et al., 2004) and emigration of astrocytic cells to the parenchyma occurs mainly postnatally (Levison et al., 1993; Suzuki and Goldman, 2003). To determine whether the presence or absence of S100B within the S100A1 astroglial population is relevant to their origin or maturation status, we tracked S100A1 and S100B expression during the process of astrogliogenesis from E16 to P14 in the mouse forebrain.

Expression of S100A1 during astrogliogenesis in the lateral wall of the telencephalic ventricle

On coronal sections of E16.5 mouse brain, we found that S100A1 is highly expressed in radial glial cells bordering the lateral wall of the ventricle, whereas it is excluded from the dorsal and medial area of the ventricle (Fig. 2A, C). On sagittal sections, the S100A1 signal decorates the ventricular zone of the ventricle rostral extension (Fig. 2E-E1). Virtually, all S100A1⁺ cells expressed RC2 (Fig. 2C, E1), GLAST (Fig. 2D and F) and tenascin C (data not shown), three markers of RGC and immature astrocytes (Misson et al., 1988; Shibata et al., 1997). Some sparse PDGFR⁺ oligodendroglial progenitor cells of the ganglionic eminence (GE) were also S100A1⁺ (Fig. 2A and supplemental Fig.2) but S100A1 was never colocalized with β -tubulin III (data not shown), confirming the strict glial identity of S100A1⁺ cells. Only half of the GLAST⁺ RGCs of the ventricular wall expressed S100A1 at E16.5 (Fig. 2F), suggesting that S100A1 characterizes only a subset of ganglionic RGC at that time. However, at P2, all the RC2⁺S100A1⁺ RGCs (Fig. 2G) were GFAP⁻ whereas at P7, which correspond to the onset of GFAP expression in the SVZ (Gates et al., 1995), a GFAP signal was detected on some S100A1⁺RC2⁺ radial processes (Fig. 2H-H3, arrowheads). Finally by P14, remnant GFAP⁺ RGCs still expressed S100A1

(Fig. 2I), but were completely devoid of RC2 staining, exhibiting a pattern similar to the one observed in adult SVZ.

Expression of S100A1 during neocortical astrogliogenesis

We were not able to detect S100A1 immunostaining in cortical RGCs before the onset of neocortical astrogliogenesis which occurs at E18.5 and which coincides with the progressive loss of the RC2 antigen and the gain of GFAP (data not shown) (Schmechel and Rakic, 1979; Voigt, 1989; Hartfuss et al., 2001). At P2, the S100A1⁺RC2⁺ cell population was heterogeneous, with half of the cells displaying a bipolar morphology typical of migrating astrocytes (Fig. 2J, arrowhead), the other half harboring the larger cell body of transforming RGCs (Fig. 2J, arrow). Between P2 and P5, virtually all neocortical RC2⁺ cells (n= 454, 3 mice) were S100A1⁺ (Fig. 2J and K) and some RC2⁺S100A1⁺ cells were GFAP⁺, confirming that the onset of S100A1 expression precedes that of GFAP (Fig. 2J, asterisks). These observations suggest that during neocortical astrogliogenesis all astrocytic cells are S100A1⁺. Many S100A1 positive cells still retain the expression of immature glial markers such as vimentin, GLAST or tenascin C (data not shown). At P7, most neocortical S100A1⁺GFAP⁺ astrocytic cells have lost RC2 expression and have the morphology of immature astrocytes with very few ramifications (Fig. 2L, arrowhead).

Expression of S100B during telencephalic astrogliogenesis

In astrocytic cells of the SVZ, S100B expression was never detected at any stage of development (Fig. 2B), and in the neocortical zone, S100B was absent from RC2⁺GFAP⁺ cells with a migratory bipolar or transforming RGC morphology. The first S100B immuno-signal was detected in astrocytic cells at P7-P10 in the parenchyma where it accounted for only 4.5% of GFAP⁺S100A1⁺ cells (Fig. 2L, arrowhead, $4.5 \pm 0.7\%$, n= 231 cells, 2 mice) (Deloulme et al., 2004). S100B expression was detected in most neocortical S100A1⁺GFAP⁺ cells by P14 (data not shown, $88 \pm 5\%$, n= 184 cells, 2 mice) which corresponds to their terminal morphological maturation (Rickmann and Wolff, 1995).

As expected, S100B was expressed in some non-astrocytic cells in the telencephalon during embryonic development and in the adult. It was detected in ependymocytes (data not shown) and in sparse cells of the ganglionic eminence at E16.5 (Fig. 2B), and in the parenchyma at P7 (Fig. 2L). These cells co-express AN2 or PDGFR α receptor (supplemental Fig. 2) and are likely to be oligodendroglial progenitor cells (Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005).

In combination with the widely used astroglial markers RC2, the use of S100A1 and S100B affords a more precise definition of the various stages of murine forebrain GFAP⁺ astrocytic development (Fig. 8). The first stage (Stage I), the RC2⁺S100A1⁺ RGC stage, coincides with the beginning of astroglial development near the wall of the lateral ventricle and then in the neocortex. The second stage (Stage II) correlated with the onset of GFAP in transforming RGCs. Two subtypes can be distinguished: RC2⁺S100A1⁺GFAP⁺ cells (Stage IIa) followed by RC2⁻S100A1⁺GFAP⁺ cells (Stage IIb). Finally, Stage III corresponds to the onset of S100B expression in neocortical GFAP⁺ astrocytes. This stage correlated with their terminal morphological maturation and defined the more mature stage of the neocortical astrocytes. Therefore, the lack of S100B expression in GFAP-expressing cells of adult SVZ, suggest that these astrocytes are blocked in immature developmental stage IIb (Fig. 8).

Subventricular GFAP expressing cells have the potential to reach the developmental stage III *in vitro*

To discriminate between cell autonomous and extrinsic microenvironmental cues as possible causes for adult SVZ astrocytes being arrested at stage IIb, we decided to compare the patterns of astroglial markers in astrocytes *in vivo* and in monolayer cultures. To this end, astrocytic monolayer cultures were derived from the cortex or the lateral ventricular wall of P2 mice. Interestingly, both types of cultures at DIV 7 presented immature astroglial characteristics with expression of embryonic markers such as RC2 (Fig. 3A, E), S100A1, GLAST or nestin (data not shown). This corresponds to the *in vivo* developmental stage I (Fig. 8). Phenotypical progression from stage I to stage III finally occurs in both types of astrocytic cultures and is accompanied by the progressive but drastic down regulation of RC2 and nestin expression, persistence of S100A1 and GLAST expression, and generalization of GFAP and S100B expression between DIV 15 and DIV 30 (Fig. 3B-E and data not shown).

These results indicate that the succession of the various astrocytic developmental stages observed *in vitro* recapitulate that seen *in vivo*. Furthermore, they demonstrate that, once they are removed from the SVZ, astrocytic cells maintained in culture evolve into S100B expressing cells. This suggests that subventricular GFAP-expressing cells are genuine astrocytes, intrinsically able to

reach stage III, but that SVZ microenvironmental factors prevents their ultimate differentiation process.

Loss of NSC potential correlates with the maturation of cultured astrocytic cells

Unlike SVZ astrocytic cells, the capacity of parenchymal astrocytes to form multipotent neurospheres *in vitro*, a reliable measure of their NSC potential, is restricted to the two first postnatal weeks (Laywell et al., 2000; Imura et al., 2003). This suggests that, *in vivo*, the loss of NSC potential by parenchymal astrocytic cells correlate with their terminal differentiation and the appearance of S100B (Fig. 2).

To test this relationship *in vitro*, SVZ and cortical astrocytic cells obtained from P2 mice were maintained in culture for 7, 15 or 30 days. We found that primary (Fig. 4), secondary and tertiary neurospheres (data not shown) could be generated, indicating that these cells are capable of self-renewal (Laywell et al., 2000; Imura et al., 2003). We also found that the amount of primary neurospheres derived from cortex as well as from SVZ, critically decreased with time, correlating with progression of astrocytic cells from stage I or II to stage III (Fig. 3, 4C). In addition, the cells contained in most neurospheres co-expressed nestin, RC2, GFAP and S100A1, but not S100B, indicating that they pertain to the developmental stage I or II (Fig. 4A, Fig. 8 and data not shown). Under differentiating conditions, astrocytic-derived neurospheres generate astrocytes, neurons and oligodendrocytes, attesting their multipotentiality (Fig. 4B). Interestingly, very few primary and no secondary S100B⁺ spheres were generated. This indicates that S100B⁺ astrocytes derived from either the subventricular or the cortical zone, do not possess self-renewal potential, but rather have restricted precursor abilities (data not shown and see below). Thus, there is a direct correlation between the loss of NSC potential and the differentiation of astrocyte to developmental stage III, independently of their territorial origin in the forebrain.

Astrocytes that have reached stage III are unable to dedifferentiate and recover NSC potential

Our data indicate that like parenchymal astrocytes *in vivo*, cultured astrocytes lose their NSC potential when they start expressing S100B. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that this loss is dependent on the time spent in culture rather than maturation processes. Furthermore, it has been suggested that parenchymal astrocytes (S100B⁺ astrocytes) have the ability to dedifferentiate into NSC (Steindler and Laywell, 2003). To compare the NSC potential of astrocytic cells at different developmental stages (i.e. S100B⁻ versus S100B⁺), we sorted EGFP⁻ and EGFP⁺ astrocytic cells from transgenic mice expressing EGFP under the control of *s100b* gene promoter (Vives et al., 2003).

We confirmed that in monolayer astrocytic cultures generated from these mice, EGFP expression increases with time similarly to endogenous S100B (Fig. 5A). At 15 and 30 DIV, approximately 15% and 60% of the cells (15%±6, n=842 and 57.2%± 8, n=520, 2 independent cultures) expressed EGFP respectively, and virtually all *s100b*-EGFP⁺ cells expressed endogenous S100B (Fig. 5B). From these cultures, EGFP positive and negative cells were purified by flow cytometry. As expected, both cell populations were GLAST⁺ and GFAP⁺ (Fig. 5D and E) and most of *s100b*-EGFP⁻ sorted cells expressed RC2 (Fig. 5C). When placed in neurosphere culture conditions, EGFP⁻ astrocytic cells generated numerous spheres devoid of EGFP expression and capable of extensive self-renewal (Fig. 5F, G and data not shown). In differentiating medium, they generated O4⁺ oligodendroglial cells, b-tubulin III⁺ neuroblasts and GFAP⁺ astrocytic cells, confirming their *in vitro* multipotentiality (Fig. 5H, I). In contrast to *s100b*-EGFP⁻ cells, *s100b*-EGFP⁺ sorted cells generated only a few, small EGFP⁺ spheres (Fig. 5F, G) with no self-renewal potential (data not shown). Most of these spheres were unipotent and gave rise only to GFAP⁺ cells under differentiating condition (Fig. 5J).

Noteworthy, an equivalent amount of neurospheres was generated from *s100b*-EGFP⁻ cells derived from either 15 or 30 DIV cultures (Fig. 5F). This indicates that “old” astrocytes have the same NSC potential than “young” astrocytes provided they are *s100b*-EGFP⁻. The converse is true with *s100b*-EGFP⁺ cells lacking their NSC potential regardless of the time spent in culture (Fig. 5F).

Interestingly, after 4 days spent in differentiating medium, EGFP⁻-derived neurospheres gave rise to some EGFP⁺GFAP⁺ astrocytes and EGFP⁺O4⁺

oligodendrocyte progenitors (Fig. 4H and I). Furthermore, when sorted EGFP⁻ cells were grown straight away in astroglial differentiating medium, they progressively expressed EGFP (Fig. 6A). These results demonstrate that, *in vitro*, *s100b*-EGFP⁻ astrocytic cells are capable of progressing toward a higher mature developmental stage. In addition, EGFP⁺ derived neurospheres gave rise to cells that continuously expressed EGFP in presence of EGF/bFGF, even after 12 DIV (Fig. 5G). This strongly suggests that, in our experimental conditions, growth factors do not induce down regulation of S100B and *de novo* acquisition of NSC potential in culture.

Taken together, these results show that, in mouse astrocytes, the onset of S100B expression defines a critical period in which NSC potential of astrocytic cell is irreversibly lost.

EGF blocks cultured astrocytic cells at the stage IIb-stage III transition and increases their NSC potential

We have shown that, unlike their *in vivo* counterpart, cultured SVZ astrocytic cells have the potential to mature into S100B⁺ cells. This suggests that SVZ environmental cues prevent their progression from stage IIb to stage III.

Many reports have shown that the EGF receptor (EGF-R) signaling pathway, activated by EGF and/or TGF- α , stimulates astrocyte development *in vitro* and *in vivo* (Burrows et al., 1997; Kornblum et al., 1998; Sibilia et al., 1998). However, we observed that EGF/bFGF treatment maintains astrocytic cells in an immature stages I or II within the neurospheres (Fig. 4). These observations prompted us to examine how EGF stimulation controls the developmental program and the NSC abilities of our astrocytic cells in culture.

To generate secondary astrocytic culture, *s100b*-EGFP⁻ astrocytes derived from 15 DIV astrocytic cultures were sorted by cytometry and grown in serum-supplemented medium in the absence or presence of EGF. In cells grown in the absence of EGF, EGFP expression progressively increased, after 8 and 15 DIV (Fig. 6A and E). In contrast, in the presence of EGF, only few EGFP expressing cells could be detected (Fig. 6B and E), suggesting that EGF inhibits progression from stage I-II to the mature stage III. This assumption was verified when we analyzed the respective proportions of RC2, GFAP and *s100b*-EGFP positive cells after 8 and 15 DIV in the absence or presence of EGF. As stated above, culturing the cells in the absence of EGF substantially increased the proportion of stage III cells (*s100b*-

EGFP⁺), and this was done mainly at the expense of stages I and IIa cells (RC2⁺) (Fig. 6C-E). This did not occur when EGF was added to the medium, but instead, the proportion of stage IIb (RC2⁻GFAP⁺EGFP⁻) was drastically increased (Fig. 6C-E). These results show a double effect of the activation of the EGF signaling pathway on the development of astrocytic cells. It favors the progression of the cells from stages I or IIa until stage IIb, and it blocks their progression to the stage III.

Next, we asked whether the arrest of astrocytic cells in stage IIb by EGF would, at least, be accompanied by the maintenance of the NSC potential. For this, we decide to compare the amount of neurosphere-forming cells between sorted EGFP⁻ cells immediately grown in neurosphere condition and sorted EGFP⁻ cells cultured in absence or in presence of EGF. Unexpectedly, it appears that more than maintenance, EGF also strongly increases the neurosphere-forming capacity of sorted EGFP⁻ astrocytic cells treated for 15 DIV. As expected, sorted EGFP⁻ cells cultured for 15 DIV in absence of EGF progressively lose their NSC potential (Fig. 6F).

Altogether, these findings show that a chronic treatment of astrocytic cells by EGF stimulates the astrocytic cell progression from stage I to stage II and arrests astrocytic cells in immature stage IIb. They also strongly suggest that EGF directly controls the NSC potential in astrocytic cultures by increasing the proportion of neurosphere forming astrocytic cells.

Exogenous EGF maintains transplanted astrocytic cells into developmental stage II *in vivo*

To determine whether microenvironmental cues control the astrocytic developmental status *in vivo*, primary astrocytic cells obtained from b-actin-GFP (Okabe et al., 1997) or *s100b*-EGFP newborn mice were grafted into the adult striatum or SVZ after 15 DIV (Fig. 7A-B). Three weeks after striatal transplantation, most b-actin-GFP grafted cells were strongly S100B⁺ indicating that they had reached stage III (Fig. 7A-A1). In addition, some of these astrocytes were completely integrated into the host brain and contacted blood vessels, suggesting a functional maturation of these cells (supplemental Fig. 7A, B). Similarly, when sorted *s100b*-EGFP⁻ cells were transplanted into the striatum, they developed into *s100b*-EGFP⁺ astrocytes (supplemental Fig. 7C). In contrast, when b-actin-GFP astrocytic cells were grafted into the adult SVZ they expressed GFAP⁺ but rarely S100B, even after

3 weeks, and thus did not develop beyond stage II (Fig. 7B). These results demonstrated that the microenvironment controls the astrocytic cell development.

Previous reports have shown that EGF-R is expressed in the SVZ of newborn and adult mice (Morshead et al., 1994; Seroogy et al., 1994; Craig et al., 1996) and some subventricular GFAP⁺ cells are immunostained for EGF-R (Doetsch et al., 2002). Therefore, the EGF-R signaling pathway may act to maintain SVZ astrocytic cells in an immature stage *in vivo*, as it does *in vitro*.

To test this hypothesis, we monitored the effects of exogenous EGF addition on the outcome of b-actin-GFP astrocytic cells grafted into the striatum. Circulating EGF had previously been shown to pass through the blood brain barrier and to diffuse into the host brain (Pan and Kastin, 1999). Interestingly, 3 weeks after grafting and EGF injection, we found that a great majority of grafted astrocytic cells were GFAP⁺ but that they remained in the developmental stage II as stated by their lack of S100B expression, as for adult endogenous SVZ astrocytic cells or for astrocytes grafted in the SVZ of untreated animals (Fig. 7C-C1). Taken together, these results suggest that, *in vivo*, EGF is a key microenvironmental factor which maintains the adult SVZ astrocytic cells in the developmental stage IIb.

Discussion

The aim of the present study was to elucidate some of the mechanisms responsible for the specific retention of the NSC potential of adult SVZ astrocytic cells. We show that S100A1 and S100B are valuable markers to characterize new developmental stages of mouse astrocytic cells in relation to their NSC attributes. *In vitro*, we demonstrate that the onset of S100B expression defines a critical period in which astrocytic cells irreversibly lose their NSC potential. Our results strongly suggest that EGF-R signaling contributes to preserve the NSC potential of astrocytes present in adult germinal zones by maintaining them in a S100B⁺ immature stage.

Technical considerations

S100A1 and S100B belong to a large group of EF-hand calcium-binding protein family containing 20 members. Although the functions exerted by S100B and S100A1 *in vivo* are still unknown, both proteins have been implicated in the control of cell proliferation and differentiation, neuritogenesis, cytoskeletal organization, and calcium homeostasis (for recent reviews see (Donato, 2001; Marenholz et al., 2004). Because S100A1 and S100B are structurally closely related proteins, and independently of technical considerations such as fixation conditions (Haan et al., 1982; Rickmann and Wolff, 1995), the crossreactivity of antibodies towards one or the other isoform could, in part, explain some controversial data concerning their cellular localization in the adult brain (Isobe et al., 1984; Rickmann and Wolff, 1995; Kahn et al., 1997). Therefore, we have carefully controlled the specificity of our antibodies on brain sections of S100A1 and S100B knockout mice (Xiong et al., 2000; Du et al., 2002; Deloulme et al., 2004) and data not shown). Furthermore, we have affinity-purified the polyclonal anti-human S100A1 antibody commercialized by DAKO to remove the non-specific neuronal staining revealed on S100A1^{-/-} mice brain sections (data not shown). For the first time, we show that both S100A1 and S100B are co-expressed in most parenchymal glial cells of the adult telencephalon including oligodendroglial cells and astrocytes. As previously described for S100B (Vives et al., 2003; Deloulme et al., 2004; Hachem et al., 2005), S100A1 is also expressed in fetal and adult oligodendroglial progenitor cells (supplemental Figure2). Our observations support multiple reports showing that expression of the S100A1 and S100B proteins is not restricted to the astrocyte lineage and therefore should no longer be used to discriminate astrocytes from other glial cells.

In the adult brain, S100A1 and S100B expression discriminate astrocytes present in germinal zones from parenchymal astrocytes

Our results clearly show that S100A1 and S100B, when coupled with GFAP immunostaining, are useful markers which permit to distinguish astrocytic cells present in germinal zones of the adult mouse brain from their parenchymal counterpart. However, one should be aware that this is true only for the mouse since, in the adult rat brain, both S100 proteins are always found co-expressed with GFAP, including within germinal zones (Raponi & Deloulme, unpublished data). Furthermore, our preliminary results show that the spatiotemporal pattern of S100A1 and S100B expression in postnatal developing forebrain differs between mouse and rat in both the astrocytic and oligodendroglial lineages (Raponi & Deloulme, unpublished data). In accordance with a recent report describing the post-natal development of rat and mouse SVZ (Peretto et al., 2005), we found that the onset of S100B expression seems to occur earlier in the astrocytic lineage of rat telencephalon (our unpublished results). The impact of such differences between the S100 spatiotemporal expression patterns of mouse and rat on the physiological function of astrocytes remains to be determined.

The onset of S100A1 expression in RGCs correlates with the onset of gliogenesis which occurs earlier in the ganglionic eminence than in the cortex (Anthony et al., 2004). We show that the expression of the calcein protein S100A1 is maintained from the RGC to the adult astrocyte stage. Monitoring RGC evolution into adult astrocytes is greatly facilitated by the subcellular localization of S100A1 which, in contrast to RC2, GLAST or GFAP, is present both in the nucleus and in the cytoplasm. S100A1 thus marks a new RC2⁺GFAP⁺ transitory developmental stage of RGCs, occurring between P2 and P5. Genetic investigations are now required to investigate whether the heterogeneous expression profile of S100A1 inside RGC population is characteristic of particular development stage of these progenitor cells.

For the first time, our results unambiguously demonstrate that the onset of S100B expression in GFAP⁺ astrocytes of the telencephalon occurs later than in more posterior regions of the mouse brain. Detection of the S100B protein correlates with a morphological maturation into protoplasmic astrocytes and defines a new developmental stage in GFAP-expressing cells. Indeed, in the neocortex (Fig. 2) as well as in the striatum (data not shown) and in the corpus callosum (Deloulme et al., 2004), most S100A1⁺GFAP⁺ cells have totally lost RC2 but do not yet express S100B

until after postnatal day 7. These data underline the fact that the onset of S100B expression, and not that of GFAP, is what defines a terminal developmental stage of GFAP⁺ astrocytes, and therefore, the absence of S100B expression in GFAP-expressing cells of germinal zones is a signature of immaturity compared to GFAP⁺S100B⁺ astrocytes.

Astrocytic NSCs and astrocytic developmental stages

Our *in vitro* investigations demonstrate that the onset of S100B expression in astrocyte cultures is correlated to the spatiotemporal expression of S100B in the developing cortex and supports a recent model proposing that maturation degree of germinal zone astrocytes is lower than their parenchymal counterpart (Laywell et al., 2000; Garcia et al., 2004). Furthermore, astrocytic cultures derived from the SVZ or the neocortex conserve their NSC potential as long as they remain S100B⁻, they lose it as soon as they become S100B⁺, and generate the same proportion of S100B⁺ astrocytes (Fig. 4). These results are in accordance with previous reports showing that the NSC attributes of parenchymal astrocytes are lost during the second postnatal week (Laywell et al., 2000). More importantly, they show that SVZ astrocytes are intrinsically able to become mature S100B⁺ astrocytes and they strongly suggest that the main differences (functional and phenotypic) between germinal zone and parenchymal astrocytes relate to their developmental stages rather than to their belonging to different astrocytic subtypes, possibly derived from different astroglial precursors.

Although we have demonstrated that the NSC potential of astrocytes is lost when they express S100B and reach the developmental stage III, our results do not allow us to assign a specific stage to NSCs. Indeed, the respective proportions of stages I, IIa or IIb within the immature S100B⁻ population do not significantly change between 8 and 15 DIV (Fig. 6). Furthermore it is important to note that, the time spent in culture does not impact on the percentage of neurospheres generated from S100B⁻ sorted cells ranging between 2.5 to 4% (Fig. 5). These percentages are low and similar to those reported previously (Laywell et al., 2000; Garcia et al., 2004). Altogether, these observations suggest that remaining in an immature S100B⁻ state is a *sine qua non* condition for germinal zone astrocytes to assume their NCS function.

Environmental cues and astrocytic development

Adult SVZ astrocytes reside in a particular and complex microenvironment called “niche” which regulates inherent NSC features (Spradling et al., 2001; Doetsch, 2003). Vasculogenesis, multiple diffusible signaling factors (TGF α , BMP2, Noggin, GABA), components of the extracellular matrix (Tenascin-C) are some of the actors present in these “niches” and implicated in self-renewal and differentiation of adult NSCs (Tropepe et al., 1997; Lim et al., 2000; Garcion et al., 2001; Liu et al., 2005). We have shown that, whereas cultured SVZ astrocytes have the potential to mature into S100B⁺ cells, they are arrested at developmental stage IIb *in vivo* (i.e. RC2⁻S100A1⁺GFAP⁺S100B⁻). Furthermore, EGF treatment blocked astrocytes at stage IIb and increased their capacity to generate neurospheres in culture. EGF also prevented the onset of S100B expression in grafted b-actin-GFP and *s100b*-EGFP astrocytic cells (Fig. 7 and supplemental Fig. 7). The physiological relevance of these results is validated by the fact that in the adult SVZ, the EGF-R is expressed in dividing progenitors as well as in some astrocytes (Doetsch et al., 2002) and EGF-R signaling has been implicated in astrocytic development and in the control of adult neurogenesis (Burrows et al., 1997; Kornblum et al., 1998; Sibilio et al., 1998). We have found that EGF is able to stimulate the expression of GFAP while maintaining these cells into an immature (i.e S100B⁻) astrocytic stage (Fig. 6). Although exogenously added EGF acts to maintain astrocytes in a relatively immature state, it is probably not the sole factor implicated in this process *in vivo* but we can propose that EGF-R signaling is a key element of the SVZ niches allowing GFAP-expressing cells to remain in developmental stage IIb which is a necessary condition for the adequate functioning of this germinal zone.

References:

- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.
- Burrows RC, Wancio D, Levitt P, Lillien L (1997) Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron* 19:251-267.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- Deloulme JC, Janet T, Au D, Storm DR, Sensenbrenner M, Baudier J (1990) Neuromodulin (GAP43): a neuronal protein kinase C substrate is also present in 0-2A glial cell lineage. Characterization of neuromodulin in secondary cultures of oligodendrocytes and comparison with the neuronal antigen. *J Cell Biol* 111:1559-1569.
- Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J (2004) Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* 27:453-465.
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13:543-550.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668.
- Du XJ, Cole TJ, Tennis N, Gao XM, Kontgen F, Kemp BE, Heierhorst J (2002) Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22:2821-2829.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Gage FH (2000) Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. *Biol Psychiatry* 48:713-714.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Garcion E, Faissner A, French-Constant C (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128:2485-2496.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol* 361:249-266.
- Gregg C, Weiss S (2003) Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 23:11587-11601.
- Haan EA, Boss BD, Cowan WM (1982) Production and characterization of monoclonal antibodies against the "brain-specific" proteins 14-3-2 and S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7585-7589.

- Hachem S, Aguirre A, Vives V, Marks A, Gallo V, Legraverend C (2005) Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* 51:81-97.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15-30.
- Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV (2003) The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* 23:2824-2832.
- Isobe T, Takahashi K, Okuyama T (1984) S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem* 43:1494-1496.
- Kahn MA, Ellison JA, Chang RP, Speight GJ, de Vellis J (1997) CNTF induces GFAP in a S-100 alpha brain cell population: the pattern of CNTF-alpha R suggests an indirect mode of action. *Brain Res Dev Brain Res* 98:221-233.
- Kornblum HI, Hussain R, Wiesen J, Miettinen P, Zurcher SD, Chow K, Derynck R, Werb Z (1998) Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci Res* 53:697-717.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13883-13888.
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE (1993) The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* 119:611-622.
- Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193:815-840.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937-950.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322:1111-1122.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-17532.
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS, Jr. (1988) Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* 44:95-108.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319.

- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-8497.
- Pan W, Kastin AJ (1999) Entry of EGF into brain is rapid and saturable. *Peptides* 20:1091-1098.
- Peretto P, Giachino C, Aimar P, Fasolo A, Bonfanti L (2005) Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* 487:407-427.
- Rickmann M, Wolff JR (1995) Modifications of S100-protein immunoreactivity in rat brain induced by tissue preparation. *Histochem Cell Biol* 103:135-145.
- Schmechel DE, Rakic P (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* 156:115-152.
- Seki T, Arai Y (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 13:2351-2358.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Seroogy KB, Numan S, Gall CM, Lee DC, Kornblum HI (1994) Expression of EGF receptor mRNA in rat nigrostriatal system. *Neuroreport* 6:105-108.
- Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* 17:9212-9219.
- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF (1998) A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo J* 17:719-731.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104.
- Steindler DA, Laywell ED (2003) Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* 43:62-69.
- Suzuki SO, Goldman JE (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci* 23:4240-4250.
- Takahashi M, Chamczuk A, Hong Y, Jackowski G (1999) Rapid and sensitive immunoassay for the measurement of serum S100B using isoform-specific monoclonal antibody. *Clin Chem* 45:1307-1311.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17:7850-7859.
- Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 457:404-419.
- Voigt T (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 289:74-88.
- Xiong Z, O'Hanlon D, Becker LE, Roder J, MacDonald JF, Marks A (2000) Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res* 257:281-289.
- Yi H, Leunissen J, Shi G, Gutekunst C, Hersch S (2001) A novel procedure for pre-embedding double immunogold-silver labeling at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem* 49:279-284.

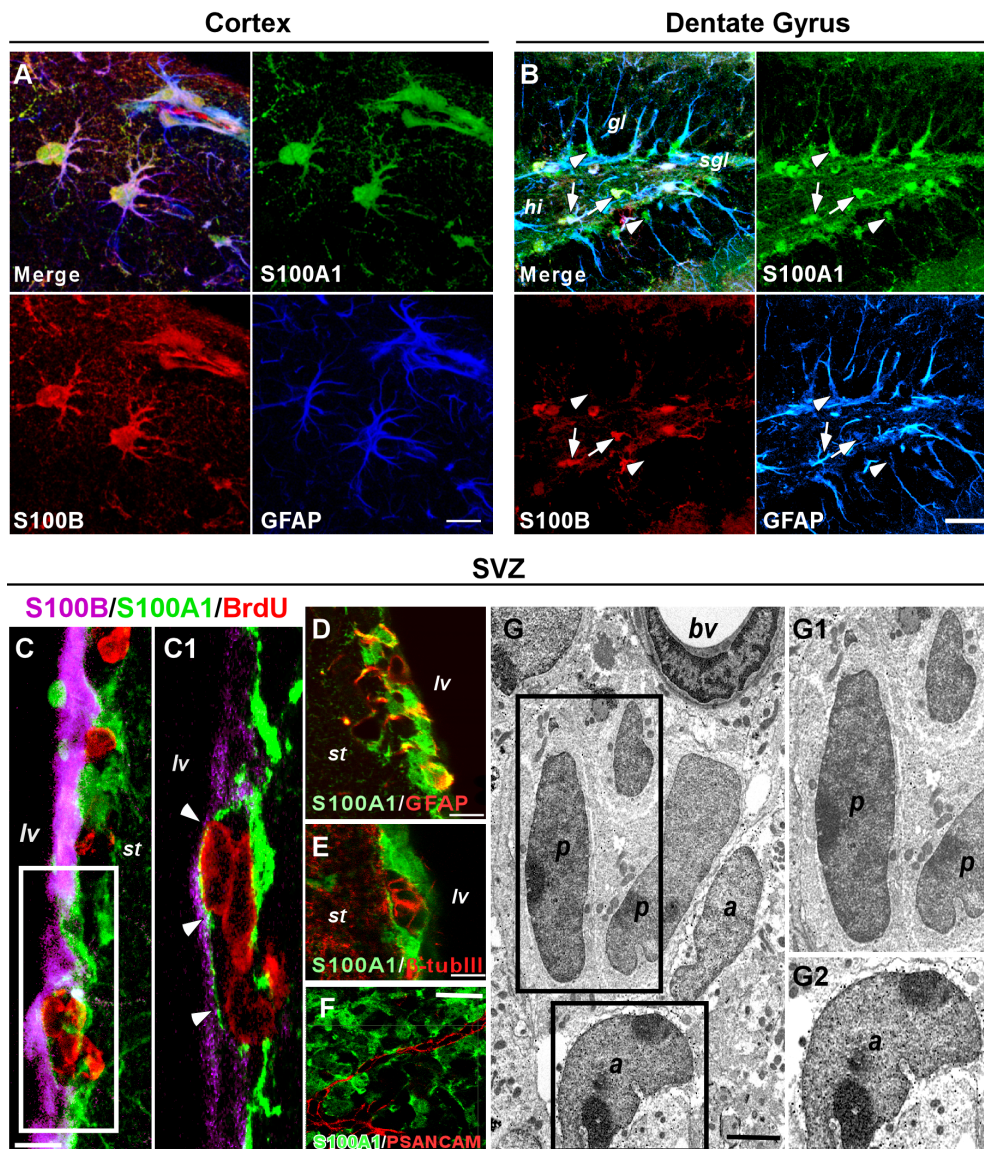


Figure 1. S100A1 and S100B expression patterns in GFAP-expressing cells of the adult telencephalon. **A-E**, brain coronal sections of neocortical parenchymal astrocytes (**A**), dentate gyrus (**B**) and lateral ventricle (**C-E**) were subjected to triple or double immunolabeling as indicated. **B**, arrowheads point to S100A1⁺GFAP⁺S100B⁻ and arrows to S100A1⁺GFAP⁺S100B⁺ stellate astrocytes. **C-G**, S100A1 expression is restricted to GFAP-expressing cells in the lateral wall of the lateral ventricle. **C**, S100A1⁻ BrdU⁺ progenitors (red) are clustered within niches spread along the ventricular wall. **C1**, power view of the area squared in **C**, showing that BrdU⁺ progenitors are separated from S100B⁺ ependymal cells by a thin protuberance emanating from a S100A1 astrocyte (arrowheads). **D**, GFAP-expressing cells are S100A1⁺. **E**, β -tubulin III⁺ neuroblasts do not express S100A1. **F**, lateral wall of the lateral ventricle whole mount showing that S100A1⁺ cells ensheath a neuroblast PSA-NCAM⁺ migrating chain. **G**, S100A1 immunogold particles are present in the cytoplasm and the nucleus of SVZ astrocytes (**G2**, **a**). Progenitor cells (**G1**, **p**) are devoid of immunolabeling. **A-F**, confocal microscopy. **G**, electron microscopy. In **A-E**, images result from the superposition of 6 to 10 optical sections and correspond to a depth of field of 3-5 mM. In **C1** and **F**, images are single optical sections (0.66 to 0.74 mM). Scale bars: 20 μ m in **A**, **C**, **D** and **E**; 50 μ m in **B** and **F**; 2 μ m in **G**. Abbreviations: *a*, astrocyte; *bv*, blood vessel; *hi*, hilus of dentate gyrus; *gl*, granular layer of dentate gyrus; *lv*, lateral ventricle; *p*, progenitor; *sgl*, subgranular layer; *st*, striatum.

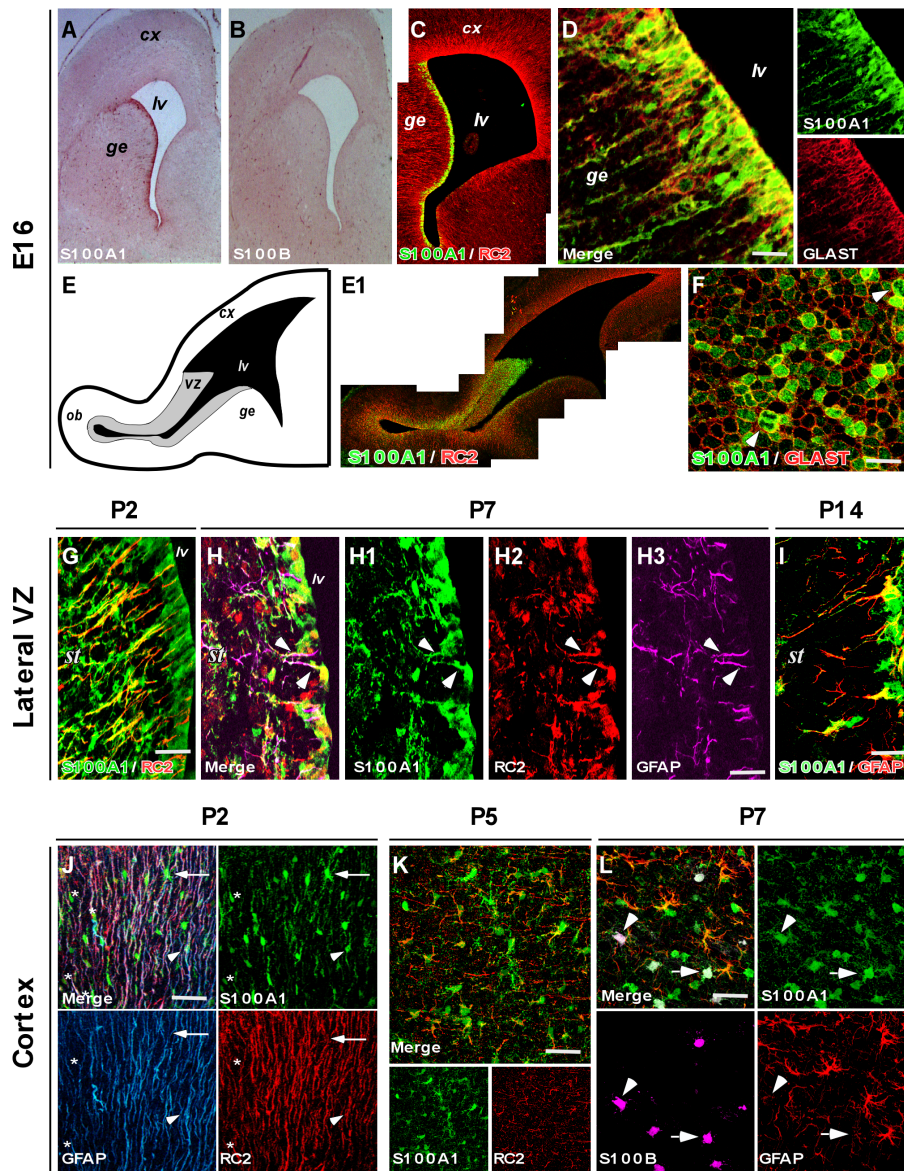


Figure 2. Spatiotemporal patterns of S100A1 and S100B expression during ventricular and neocortical astrogliogenesis. **A-D** and **G-I**, coronal sections; **E-E1** and **J-L**, parasagittal sections; **F**, whole mount of the lateral wall of the lateral ventricle (lv). **A-F**, at E16, S100A1 (not S100B) is a marker of RC2⁺ (**C** and **E**) GLAST⁺ (**D** and **F**) RGCs lining the lateral wall of the lv. **F**, S100A1 characterizes a subset of GLAST⁺ RGCs and the arrowheads point to mitotic S100A1⁺GLAST⁺ RGCs. **E-E1**, schematic drawing (**E**) and low power view (**E1**) of the main lv and its rostral extension delineated by RC2⁺ RGCs (red). S100A1/RC2 colocalisation (yellow) is highest in the rostral ventricular zone (vz). **G-I**, continued S100A1 expression during the postnatal transformation of vz RGCs into astrocytes. In **H**, arrowheads point to the processes of S100A1⁺ RGC-transforming cells which temporarily co-express RC2 and GFAP. **J-L**, Expression of S100A1 during cortical astrogliogenesis. At P2 (**J**) S100A1 is expressed in large transforming (arrow) and in bipolar migrating (arrowhead) RGCs. Asterisks indicate RC2⁺S100A1⁺GFAP⁻ cells. At P5 (**K**), virtually all RC2⁺ cells express S100A1. Some GFAP⁺S100A1⁺ astrocytes start to express S100B at P7 (**L**, arrowhead). The arrow points to a S100A1⁺S100B⁺GFAP⁻ cell which likely corresponds to an oligodendroglial cell. **A** and **B** are images captured with a Zeiss conventional microscope. **D** and **G-L** result from the superposition of 6 to 8 optical sections captured with Leica confocal microscope, whereas **F** is a single x-y optical section. Scale bars correspond to 20 μ m in **D**, **F**, **G**, **H3** and **I**. cx, cortex; ge, ganglionic eminence; lv, lateral ventricle; ob, olfactory bulb; st, striatum.

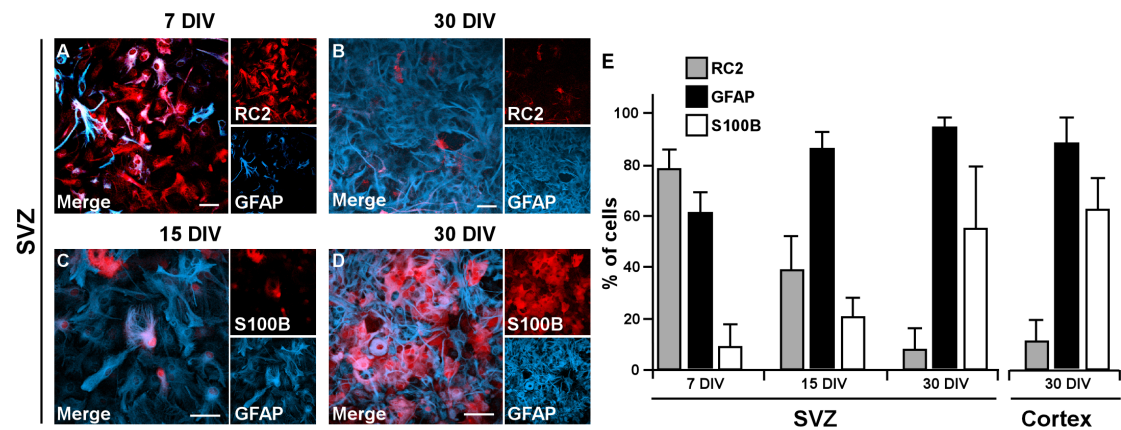


Figure 3. Cultured subventricular and cortical astrocytes mature into S100B⁺ cells. Astrocytic cultures derived from the SVZ (A-D) and the neocortex (not shown) of newborn mice were immunolabeled at 7, 15 and 30 DIV as indicated. The changes in the percentage of RC2⁺, GFAP⁺ and S100B⁺ cells in the SVZ and the cortical cultures are represented in E. Each bar represents the average of 2 to 4 independent cultures. Errors are \pm SD. DIV, days *in vitro*.

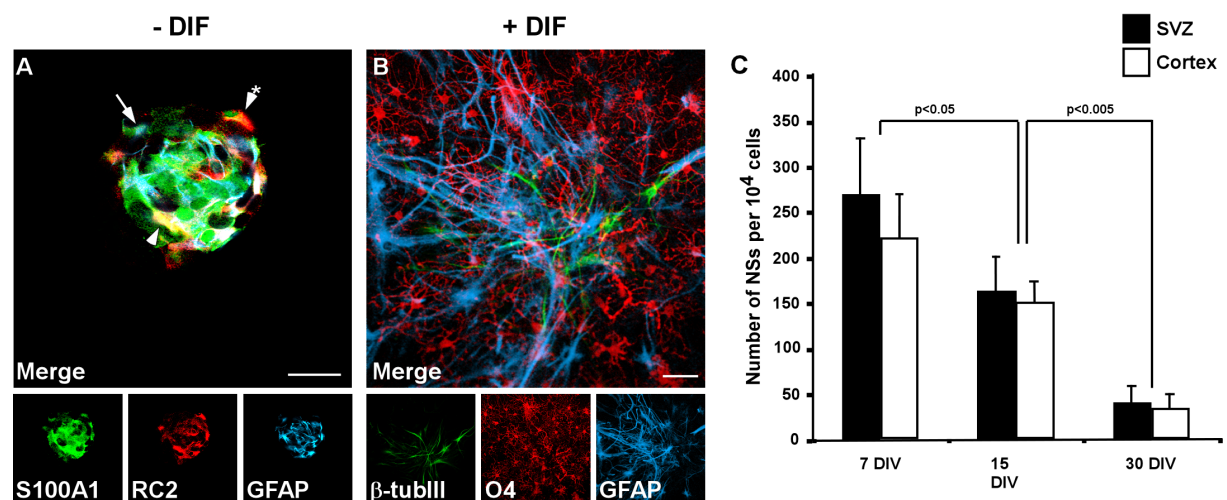


Figure 4. S100B expression in astrocytes correlates with the loss of astrocytic NSCs in culture. A-C, primary neurospheres (NSs) were generated from 10⁴ dissociated astrocytic cells of SVZ and cortical monolayer cultures at 7, 15 and 30 DIV. A, Immunolabeling shows the presence of astrocytic cells in developmental stage I (RC2⁺S100A1⁺GFAP⁺, arrowhead plus asterisks, see also figure 8), stage IIa (RC2⁺S100A1⁺GFAP⁺, arrowhead) or stage IIb (RC2⁻S100A1⁺GFAP⁺, arrow) in NSs at 12 DIV. B, after 4 day in differentiating conditions, NSs give rise to β -tubulin III⁺ neuroblasts, O4⁺ oligodendroglial cells and GFAP⁺ astrocytes. C, quantification of NSs generated from 10⁴ cells with a diameter higher than 50 μ m. Each bar represents the average of 2 independent cultures, each counted in triplicate. Errors are \pm SD. In A, the confocal image corresponds to a single optical section (0.66 to 0.74 μ m) and in B, to a stack of 8 optical sections. Scale bars, 20 μ m.

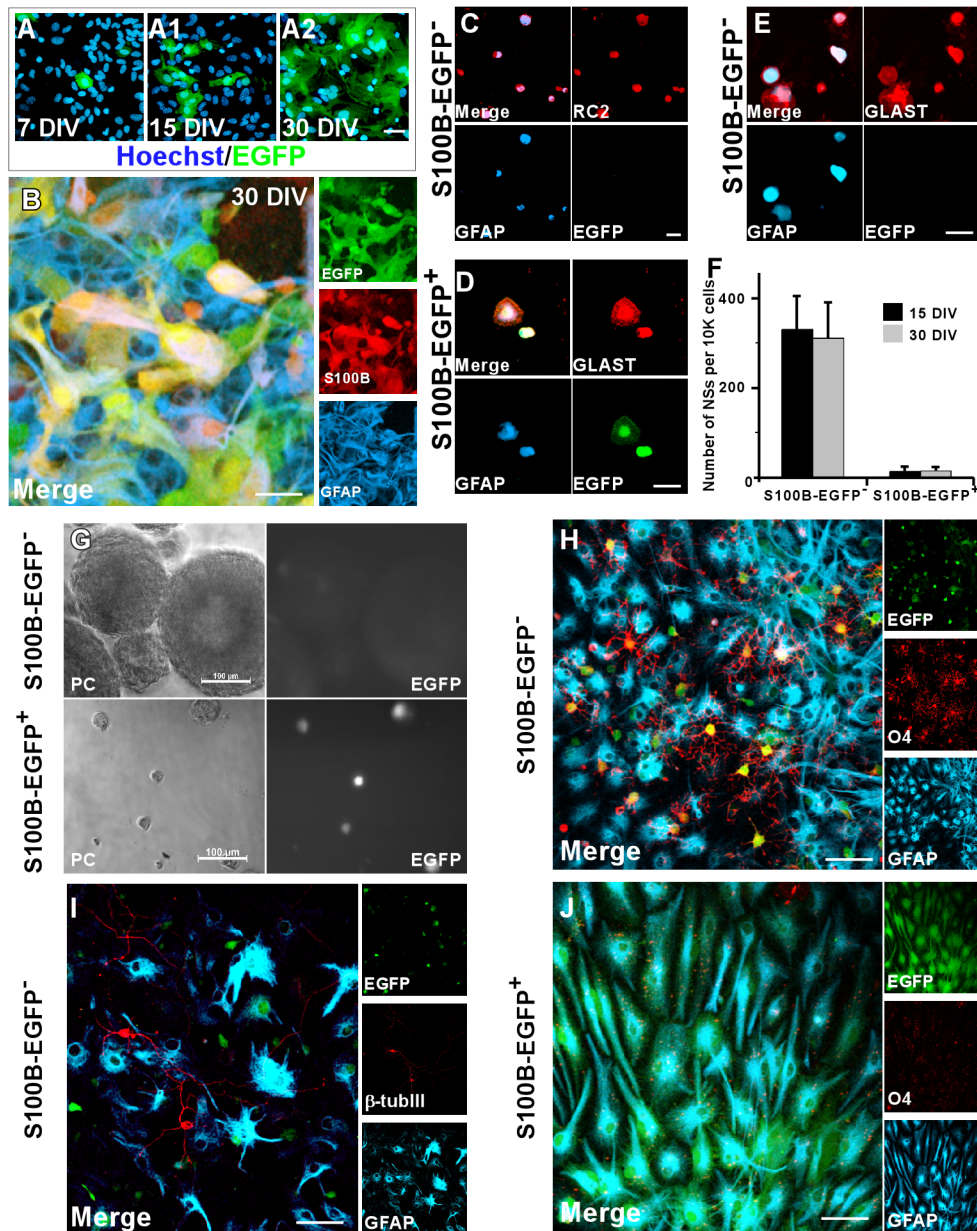


Figure 5. Activation of the *s100b* gene in *s100b*-EGFP astrocytes is directly linked to the irreversible loss of their NSC potential. **A** and **B**, cultured astrocytic cells were obtained from whole forebrains of newborn transgenic *s100b*-EGFP mice and were characterized at 7, 15 and 30 DIV as indicated. **A-A2**, EGFP expression increases with the time spend in culture. **B**, at 30 DIV, virtually all EGFP⁺ cells express both endogenous S100B and GFAP corresponding to developmental stage III (Fig. 8). **C-E**, EGFP⁺ and EGFP⁻ cells derived from 15 and 30 DIV cultures were sorted by FACS and double-immunolabeled as indicated. Most sorted EGFP⁻ cells are stage I or IIa RC2⁺GFAP⁻ or RC2⁺GFAP⁺, all of them express GLAST cells (**C,E**), while EGFP⁺ cells are stage III GFAP⁺ GLAST⁺ cells (**D**). **F-G**, unlike sorted EGFP⁻ cells most sorted EGFP⁺ cells are unable to generate NSs with a size higher than 50 μm. EGFP expression is maintained in small NSs derived from sorted EGFP⁺ cells even after 12 days of EGF/bFGF treatment (**G**). In **F**, each bar represents the average of 4 independent cultures, each counted in triplicate. Errors are ± SD. **H-I**, NSs derived from EGFP⁻ cells are multipotent and give rise to O4⁺ oligodendroglial cells, GFAP⁺ astrocytic cells and β-tubulin III⁺ neuroblasts, whereas the small NSs derived from sorted EGFP⁺ cells are mostly unipotent and give rise to GFAP⁺ astrocytes (**J**). **A** and **G**, Zeiss conventional microscopy. **B-F** and **H-J**, stake of 5 to 8 optical sections captured with Leica confocal microscope. Scale bars: 20 μm in **A-E** and **H-J**; 100 μm in **G**.

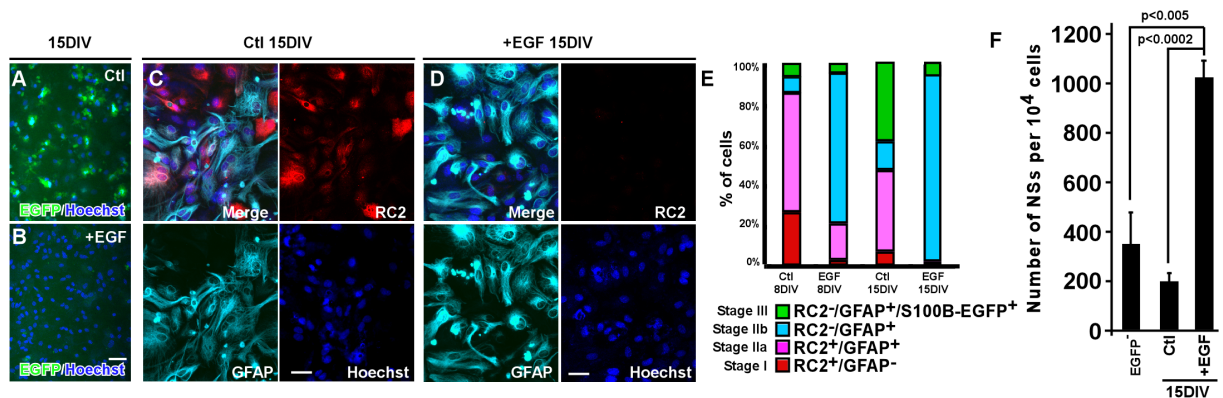


Figure 6. EGF prevents the activation of the *s100b* gene and maintains astrocytic cells in developmental stage IIb. **A-D**, sorted *s100b*-EGFP⁺ cells (EGFP⁺) from 15 DIV primary astrocytic cultures were replated in medium with serum in the absence (Ctl) or in the presence of EGF (+EGF), and double-immunolabeled for the presence of RC2 and GFAP at 8 DIV and 15 DIV as indicated. EGF treatment stimulated the transition from stages I and IIa to stage IIb and maintained the cells in this stage, as visualized by the diminution of the RC2 signal at 15DIV (**C-D**). **E**, percentages of cell population in developmental stage I, IIa, IIb and III. **F**, EGF treatment increases the number of NSs generated from cultured astrocytic cells after 15 DIV. NSs are generated from 15 DIV secondary astrocytic culture in absence (Ctl) or in presence of EGF (+EGF) and from sorted *s100b*-EGFP⁺ cells (EGFP⁺) derived from 15 DIV primary culture. Each bar represents the average of 2 independent cultures, each counted in triplicate. Errors are \pm SD, Scale bars correspond to 50 μ m in **A-B** and to 20 μ m in **C-D**.

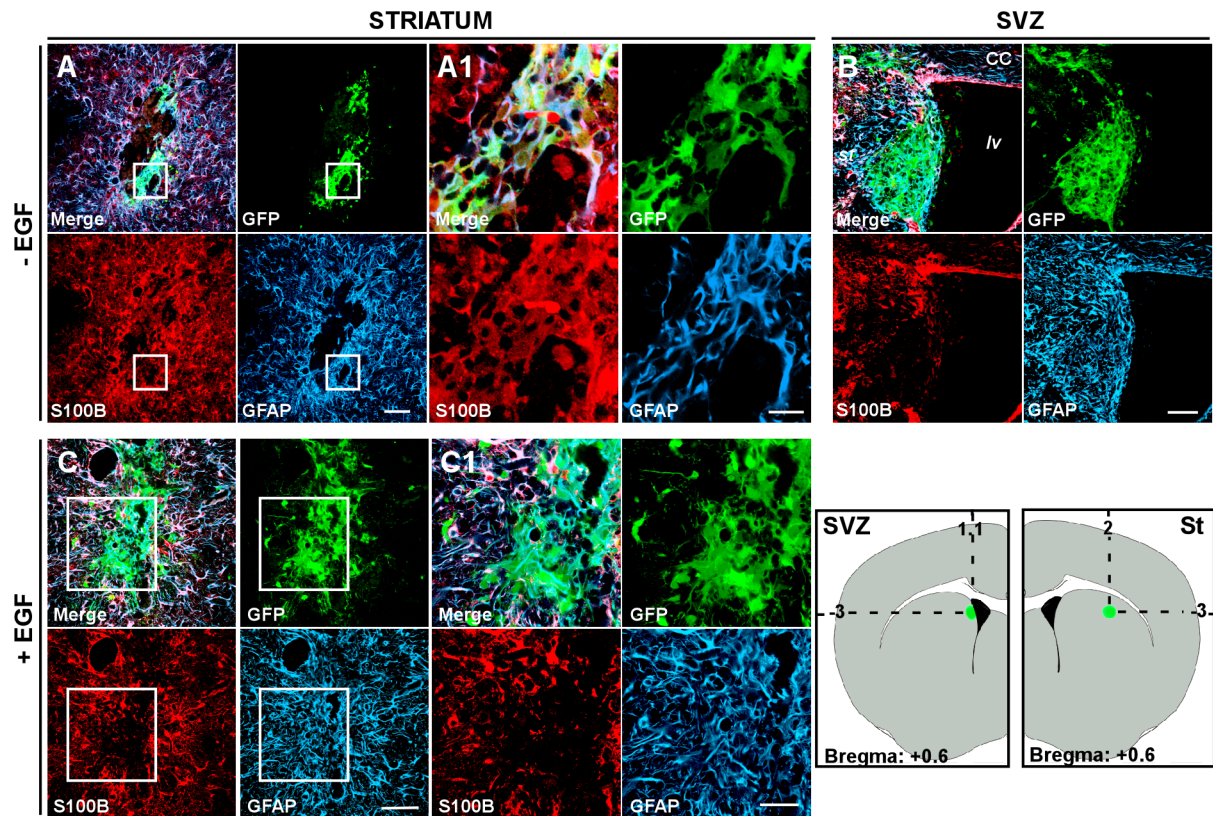


Figure 7. Maturation of grafted astrocytic cells is controlled by micro-environmental factors. **A-C**, 15 DIV cultured astrocytic cells derived from transgenic newborn mice expressing GFP under the ubiquitous b-actin promoter were grafted stereotactically in the striatum (**A-A1**, **C-C1**) or in the SVZ (**B**) of adult mice as indicated in **D**. GFP⁺ cells grafted in the striatum integrated the brain host and became S100B⁺ after 3 weeks (**A**, **A1**) whereas SVZ grafts failed to express S100B (**B**). Multiple i.v. injections of EGF prevented the expression of S100B in grafted GFP⁺ astrocytic cells in the striatum (**C**). Scale bars correspond to 50 μ m in **A**, **B** and **C** and to 20 μ m in **A1** and **B1**. cc, corpus callosum, /v, lateral ventricle, st, striatum

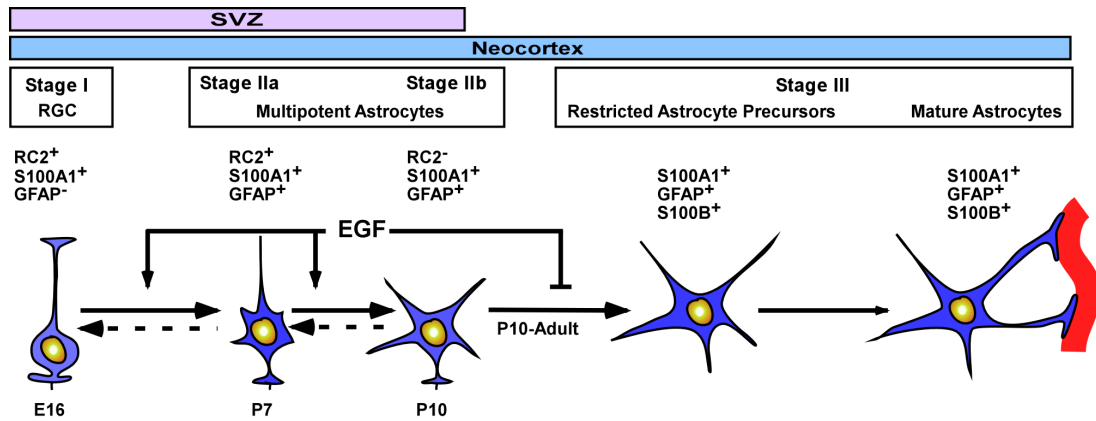
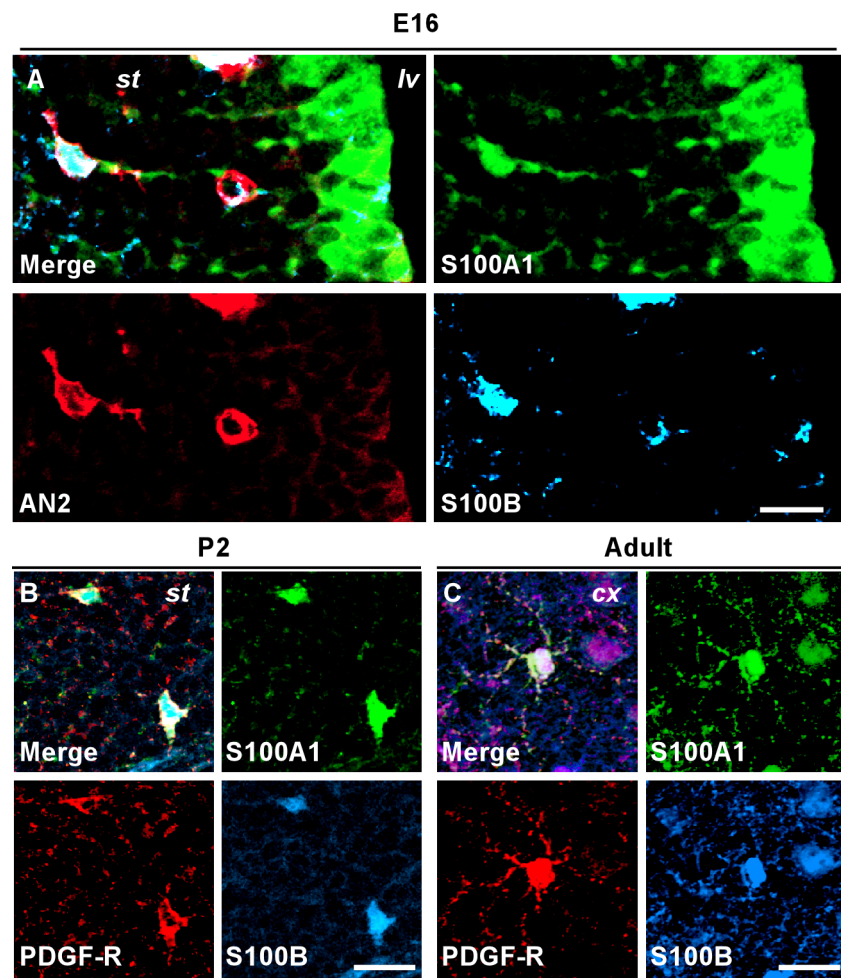
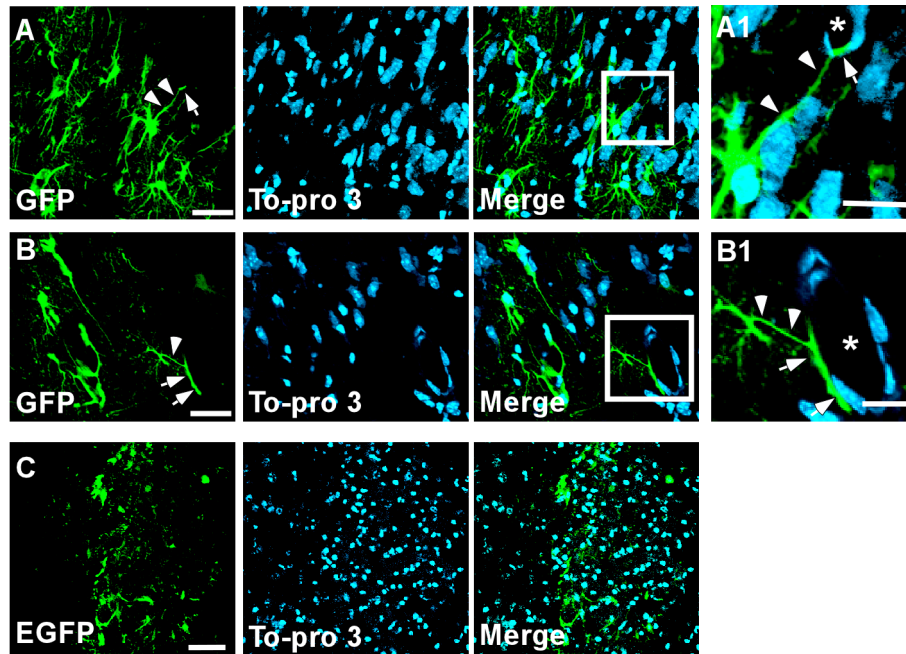


Figure 8. Model of GFAP astrocytic development. The onset of S100A1 expression in embryonic RGC characterizes the stage I. The onset of GFAP expression in parallel with the progressive down regulation of RC2 characterizes stage II including RC2⁺S100A1⁺GFAP⁺ (Stage IIa) and RC2⁻S100A1⁺GFAP⁺ (Stage IIb) phenotypes. Next, GFAP⁺ astrocytes continue their developmental program to become GFAP⁺S100B⁺ restricted astrocyte precursors and finally differentiate into mature astrocytes (stage III). Hence, EGF signaling exerts a double effect on GFAP⁺ astrocytic development. It activates the transition from stages I and IIa to the stage IIb and blocks the transition from stage IIb to stage III.



Supplemental figure 2

Supplementary figure 2. S100A1 and S100B expression in oligodendroglial cells. E16 (**A**), P2 (**B**) and adult (**C**) coronal sections were triple-immunolabeled as indicated in the figure. Images result from the superposition of 12 confocal -y focal sections. *st*, striatum; *cx*, cortex; *lv*, lateral ventricle; Scale bar = 20 μ m.



Supplemental figure 7

Supplemental figure 7. Transplanted astrocytic cells integrate the host brain. **A-B**, 15 DIV astrocytic cultures derived from transgenic β -actin GFP-mice were dissociated and cells were injected into the striatum of C57/BL6 host mice. After 3 weeks, grafted astrocytes extended thin process (arrowheads) and developed astrocyte end-feet (arrows) around blood vessels (asterisks in **A1** and **B1**). **A1** and **B1** are higher power views of the areas squared in **A** and **B** respectively. **C**, *s100b*-EGFP negative cells sorted from 15DIV astrocyte cultures derived from *s100b*-EGFP mice were grafted in the striatum of C57/BL6 host mice. Some astrocytic cells reached developmental stage III as evidenced by their EGFP expression. Nuclear counterstaining was performed with To-pro 3 (1/1000). Scale bar = 20 μ m for **A**, **B**, **C** and 10 μ m for **A1** and **B1**.

7.1.3 Discussion

Jusque dans les années 1990, la conception du développement et de la plasticité du cerveau dépendait encore d'interprétations obtenues à partir de travaux réalisés entre la fin du 19^{ème} et le début du 20^{ème} siècle par Wilhelm His puis par Ramon y Cajal.

Wilhelm His (1831-1904) était un très grand anatomiste et embryologiste suisse/allemand. Il a effectué de brillants travaux en histologie. Son objectif était notamment de comprendre l'origine embryonnaire des différents types cellulaires composant un tissu. Pour cela, il inventa en 1865, le microtome. De son étude sur le SNC en développement, il détermina l'existence de deux types cellulaires majeurs, les cellules rondes qui généreront les futures neurones, et les cellules très allongées (glie radiale) à l'origine des futures cellules gliales. Cependant, si ses observations étaient correctes, son interprétation va involontairement, être à la source du premier dogme en neurobiologie qui va durer pendant près de cent ans : "les cellules nerveuses et gliales proviennent de deux lignages complètement distincts (1889)."

Ramon y Cajal (1852-1934) était lui aussi un grand anatomiste espagnol. Dans les années 1900, Il fit de très importants travaux sur les techniques histologiques et de micrographie (marquages de golgi) mais aussi sur le fonctionnement du système nerveux. Cependant, de ces études vont naître, là aussi, un dogme en neurobiologie développementale toujours ancré dans l'inconscient collectif : "La neurogenèse n'a lieu qu'au cours du développement. Chez l'adulte, les voies nerveuses sont fixées et immuables : elles ne peuvent que mourir, rien ne peut être régénéré."

Il faudra attendre près de cent ans, dans les années 1990, pour que des découvertes majeures fassent complètement évoluer tous ces anciens dogmes. Une des découvertes les plus importantes a été de démontrer la persistance d'une neurogenèse chez l'adulte. De nouveaux neurones sont en effet, générés dans un cerveau mature de rongeurs, d'oiseaux, et de primates (Garcia-Verdugo et al., 2002; Gould et al., 1999a; Gould et al., 1999b). La source de ces neurones dans le SNC adulte est les cellules souches neurales adultes (Gage, 2000). Les cellules souches adultes diffèrent des cellules souches du zygote ou de l'embryon. En effet, les cellules souches du zygote sont *totipotentes*, c'est à dire qu'une seule cellule peut générer toutes les cellules d'un organisme entier. Les cellules souches

embryonnaires (cellules ES) proviennent de blastocystes. Ces cellules sont dites *pluripotentes*, c'est-à-dire qu'elles sont un peu plus restreintes dans leur potentiel de différenciation. Elles peuvent donner naissance à toutes les cellules de l'organisme sauf le trophoblaste du placenta. Les cellules ES sont notamment utilisées pour générer des animaux génétiquement modifiés. Puis, de nombreuses cellules souches deviennent des cellules souches *multipotentes*. Les cellules souches neurales (NSC) n'en sont qu'un exemple parmi d'autres. Les cellules souches multipotentes se localisent dans un organe donné (cerveau, moelle osseuse, peau, poils, intestin...). Embryonnaire puis adulte, elles assurent le développement puis l'homéostasie de l'organe considéré (Gage and Verma, 2003).

La découverte de NSC chez de nombreuses espèces adultes va permettre à la communauté scientifique de concevoir qu'une neurogenèse puisse se dérouler aussi chez l'adulte. Le dogme de Ramon y Cajal toucha définitivement à sa fin lorsque la neurogenèse provenant de NSC fût clairement établi chez les mammifères (Doetsch et al., 1999a, Gage, 2000; Gould et al., 1999b).

Le second dogme, celui de Wilhelm Hils, persista jusque dans les années 2000. Il fallut attendre que certaines équipes démontrent directement, qu'au cours du développement, des cellules de la glie radiale étaient des précurseurs d'astrocytes mais aussi de neurones et même d'oligodendrocytes. Donc le lignage neuronal et glial n'est pas forcément distinct, des cellules gliales peuvent aussi être à l'origine de cellules neuronales (Anthony et al., 2004; Malatesta et al., 2003; Merkle et al., 2004; Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2002; Noctor et al., 2004).

Ces résultats s'accordent parfaitement avec la caractérisation des cellules souches neurales adultes démontrant que celles-ci présentent des caractéristiques phénotypiques et structurales de cellules gliales astrocytaires.

7.1.3.1 Les cellules GFAP de la zone sous ventriculaire adulte : de vrai astrocytes ?

Le fait que des cellules souches puissent posséder des caractéristiques de cellules différenciées a été accueilli avec un certain scepticisme de la part de la communauté scientifique. C'est pourquoi différentes hypothèses ont été émises afin de concilier ce

résultat avec la conception que les scientifiques se faisaient d'une cellule souche. Deux hypothèses principales sont le plus souvent énoncées : 1) Les cellules GFAP⁺ de la SVZ ne sont pas des astrocytes. En effet, le marquage GFAP peut caractériser d'autres cellules que des astrocytes notamment au niveau du foie, des reins ou des poumons (Buniatian et al., 1998; Bush et al., 1999; Neubauer et al., 1996). Ainsi les cellules souches adultes expriment la GFAP mais n'auraient pas de lien avec les astrocytes du parenchyme. 2) Les cellules GFAP appartiennent bien à la lignée astrogliale (idée du continuum de la glie radiale aux astrocytes), mais ils doivent être dans un état d'immaturité leur permettant de conserver leurs propriétés germinales (Garcia et al., 2004; Gotz and Steindler, 2003; Laywell et al., 2000; Steindler and Laywell, 2003).

Dans cet article, nous nous sommes intéressé aux cellules GFAP⁺ des zones germinatives et du parenchyme. Nous avons ainsi observé que ces deux populations se distinguent par leur contenu en protéines S100A1 et S100B. Nos études développementales nous ont ensuite montré que la différence principale entre des cellules GFAP⁺ S100A1⁺ S100B⁻ (zones germinatives) et des cellules GFAP⁺ S100A1⁺ S100B⁺ (parenchyme) était liée à leur stage de développement. Ainsi, contrairement aux données bibliographiques, la S100B est un marqueur très tardif du lignage astrocytaire ; et les astrocytes du parenchyme exprimant la S100B sont dans des stades de différenciation plus avancé que leur homologues S100B⁻.

Dans la SVZ adulte, les cellules GFAP⁺ expriment la protéine S100A1 mais pas l'isoforme S100B. Cette observation pourrait, là aussi, refléter des différences de maturation par rapport aux cellules du parenchyme. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mis en culture ces cellules et nous avons étudié leur différenciation *in vitro*. Nous nous sommes ainsi aperçu, que ces cellules étaient intrinsèquement capable de devenir GFAP⁺ S100A1⁺ S100B⁺ et de présenter les mêmes caractéristiques phénotypiques que leur homologue du parenchyme. Ceci suggérerait que ces cellules GFAP étaient réellement des astrocytes. Cette observation a été confirmée *in vivo*, grâce à nos expériences de ré-implantation d'astrocytes. En effet, si les astrocytes sont transplantés dans des zones non germinatives, ils deviennent S100B⁺ et s'intègrent dans l'hôte en faisant des pieds astrocytaires (figures supplémentaire N°7). A l'inverse, s'ils sont ré-implantés dans les zones germinatives, il adoptent le même phénotype (GFAP⁺ S100A1⁺ S100B⁻) que les cellules GFAP de cette zone.

Nos résultats supportent donc la deuxième hypothèse en suggérant que les cellules GFAP de la SVZ adulte sont des astrocytes maintenus dans un état immature (S100B⁻). En outre, nos travaux démontrent que l'expression de GFAP n'est pas un marqueur fiable de la différenciation terminale d'une cellule astrogliale en astrocyte, puisque des cellules GFAP⁺ S100B⁻ deviennent progressivement GFAP⁺ S100B⁺ au cours du temps en culture. Il existe donc, au sein des cellules GFAP, différents stages de maturation, et la protéine S100B est le premier marqueur à clairement le démontrer.

7.1.3.2 Les cellules astrocytaires S100B⁻ sont-elles toutes des cellules souches neurales ?

Nos résultats ont nettement démontré que toutes les cellules astrocytaires multipotentes sont dans un état d'immaturité. En effet, seules les cellules astrogliales n'exprimant pas la protéine S100B possèdent des propriétés de cellules souches neurales. Les astrocytes plus matures, devenus S100B⁺ sont irréversiblement engagés dans la voie astrocytaire et ne possèdent plus de potentialités de différenciation multiple.

Néanmoins, si tous les astrocytes multipotents sont immatures, la réciproque est fautive, au moins en partie. En effet, lorsque l'on trie des astrocytes EGFP⁺ (S100B⁻), on s'aperçoit que tous ne forment pas des sphères. Donc toutes les cellules astrocytaires immatures ne présentent pas des propriétés de cellules souches, à un instant donné.

Cependant, dans les zones germinatives, aucune cellule GFAP⁺ n'exprime la protéine S100B; elles sont donc toutes dans un état immature. Ce résultat intrigant suggère que cet état immature, de tous les astrocytes de la SVZ, est important pour les fonctions de certains astrocytes germinatifs. Cette suggestion est supportée par nos travaux où l'on a pu observer que 1) Les cellules astrogliales à l'intérieur de la neurosphère sont toutes dans un état d'immaturité. 2) La proportion de cellules souches à l'intérieur des populations immatures était toujours constante, quelque soit le temps passé en culture (Figure 5F). Ceci suggère l'existence d'un contrôle fin de l'homéostasie des cellules souches par les cellules immatures. Dès lors on peut émettre l'hypothèse que très probablement, le maintien de cellules avec

des propriétés multipotentes nécessite des communications intercellulaires avec des cellules immatures. C'est pourquoi, si tous les astrocytes immatures n'assument pas directement des fonctions de NSC au sein de la SVZ, ils participent probablement à la régulation de celles-ci.

De plus, ce système de régulation n'est absolument pas figé et présente une certaine "plasticité" ou "souplesse". En effet, si dans nos conditions classiques de culture il y a un contrôle strict de la proportion de NSC, cette régulation peut être modulée par des facteurs environnementaux. Ainsi, lors du traitement de nos cultures astrocytaires par l'EGF, la proportion de cellules souches à l'intérieur de la population immature passe de 3% à plus de 10%. Ceci indique des modifications dans le contrôle homéostatique des NSC et montrent qu'en fonction des demandes environnementales, les quantités de cellules souches peuvent varier, probablement à partir du stock de cellules astrocytaires immatures.

7.1.3.3 Les astrocytes S100B⁺ : des cellules différenciées de façon terminale ?

Si nos résultats démontrent que l'expression de la protéine S100B, dans les astrocytes GFAP⁺, caractérise une évolution dans leur stade de développement, ceci n'implique pas qu'ils soient devenus post-mitotiques et différenciés de façon terminale. En effet, dans nos expériences *in vitro*, de tri cellulaires, les cellules EGFP⁺ (S100B⁺) sont capables de former des petites sphères primaires mais pas de secondaires. Ceci démontre que certains astrocytes S100B⁺ possèdent encore des capacités de prolifération limitées caractéristiques de cellules progénitrices. Ces résultats sont confortés par nos expériences de différenciation de ces sphères, où seuls des astrocytes peuvent être générés. Ainsi, les cellules S100B⁺ ont évolué dans leur développement, certaines sont devenues des progéniteurs d'astrocytes alors que d'autres sont encore plus différenciées, elles ont perdu toute possibilité de prolifération et sont devenues des astrocytes terminalement différenciés.

Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées, *in vivo*, après une gliose réactionnelle. Nous avons en effet confirmé qu'après une lésion cérébrale, les astrocytes réactionnels et proliférants étaient bien S100B⁺ (données non illustrées). Donc, il existe dans le parenchyme adulte des cellules progénitrices

d'astrocytes, cependant la S100B ne permet pas de les distinguer des astrocytes différenciés de façon terminale. De nouveaux marqueurs de la voie astrocytaire restent encore à être découverts.

De façon très intéressante, les résultats obtenus dans la lignée gliale astrocytaire sont réminiscents de ceux obtenus dans la lignée oligodendrogliale. En effet, les OPC multipotents expriment uniquement la S100A1 ; à l'inverse ceux restreints dans la voie de différenciation oligodendrogliale ainsi que les cellules oligodendrogiales post-mitotiques expriment la S100A1 et la S100B. Les calcioprotéines S100A1 et S100B en association avec des marqueurs spécifiques d'une lignée gliale sont des outils intéressants afin d'étudier, chez la souris, le développement et la potentialité de ces cellules *in vivo* et *in vitro*.

7.2 Mécanismes moléculaires contrôlant l'activation des astrocytes germinatifs.

7.2.1 Rôle de Mash1 dans le télencéphale

Les mécanismes contrôlant la spécification cellulaire des cellules précurseurs ont été principalement étudiés au cours du développement embryonnaire du SNC. Ces spécifications cellulaires sont majoritairement régulées par des facteurs de transcriptions, notamment de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) (Bertrand et al., 2002). Au niveau des régions ventrales du télencéphale, le facteur de transcription bHLH Mash1 a été démontré comme étant essentiel pour la production de cellules précurseurs neuronales (Casarosa et al., 1999; Horton et al., 1999; Torii et al., 1999). Au niveau des régions dorsales, en coopération avec les protéines Neurogénine (d'autres protéines pro-neuronales), Mash1 induit une spécification neuronale des cellules multipotentes embryonnaires, tout en inhibant leur différenciation astrocytaire (Nieto et al., 2001).

De façon extrêmement intéressante, il a été observé que Mash1 peut activer un programme de différenciation GABAergique dans les progéniteurs neuronaux du télencéphale, impliquant une induction du facteur de transcription à homéodomaine DLX2 (Fode et al., 2000). En outre, Mash1 a récemment été démontré comme restant exprimé dans la SVZ post-natale et adulte dans les cellules à haut pouvoir prolifératif (type C). Dans ce cas, Mash1 est impliqué à la fois dans la spécification neuronale et oligodendrogliale (Parras et al., 2004).

Au commencement de notre travail sur la SVZ, aucun facteur de transcription embryonnaire n'avait été démontré comme s'exprimant chez l'adulte. Depuis un an, d'autres facteurs sont venus s'ajouter à Mash1 : Olig2 dans les type C et son rôle dans la spécification astrocytaire et oligodendrogénique et Pax6 dans la spécification neuronale (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005; Marshall et al., 2005). Cependant, aucun facteur n'a clairement été établi comme s'exprimant dans les astrocytes de la SVZ possédant des propriétés de NSC.

Les résultats démontrant que la mutation de Mash1 affecte à la fois la voie neurogénique et gliale, associé au fait que Mash1 est un facteur de transcription extrêmement précoce et activant d'autres facteurs pour induire une spécification, nous a conduit à émettre l'hypothèse que Mash1 pouvait être un facteur de

transcription impliqué dans l'activation des astrocytes multipotents. Cependant, il n'y a actuellement aucune donnée soutenant cette hypothèse ; au cours du développement embryonnaire Mash1 est d'ailleurs considéré comme ne s'exprimant pas dans les cellules de la glie radiale (Hartfuss et al., 2001).

Dans cette dernière partie de la thèse, je vais vous présenter des résultats préliminaires sur l'expression du facteur de transcription Mash1 dans les cellules gliales de la SVZ ainsi que les perspectives de travail qui en découlent.

7.2.2 Continuum d'expression de Mash1 de la glie radiale aux astrocytes de la SVZ

Récemment, des études sur la glie radiale du mur ventriculaire striatal ont pu démontrer que ces cellules évoluaient directement, au cours du développement embryonnaire, en astrocytes de la SVZ adulte (Merkle et al., 2004; Tramontin et al., 2003). Chez l'embryon comme chez l'adulte, ces cellules gliales sont les précurseurs primaires des neurones olfactifs et permettent aussi une oligodendrogenèse et une astroglionogenèse (Ahn and Joyner, 2005; Anthony et al., 2004; Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005; Malatesta et al., 2003; Merkle et al., 2004). Cette conservation de fonction suggère, dans une certaine mesure, une conservation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation/spécification des cellules souches gliales.

Mash1 est un facteur de transcription précoce impliqué à la fois dans la spécification neuronale et oligodendrogliale (Parras et al., 2004). C'est pourquoi, il nous a semblé être un bon candidat pouvant s'exprimer de l'embryon à l'adulte dans le "lignage glial" des cellules souches. Pour tester cette hypothèse nous avons, dans un premier temps, déterminer si Mash1 pouvait s'exprimer de la glie radiale embryonnaire aux astrocytes de la SVZ adulte. Nous avons ainsi observé que près de 3% de la glie radiale S100A1⁺ à E16, exprimait le facteur de transcription Mash1 (Figure 21). Le niveau d'expression de Mash1 dans les cellules de la glie radiale est en général plus faible que dans les progéniteurs secondaires. Cette observation supporte l'idée que l'augmentation transitoire de Mash1 est nécessaire pour la progression de la zone ventriculaire vers la SVZ et conduit à l'initiation de la neurogenèse (Casarosa et al., 1999; Torii et al., 1999). Ensuite, au cours du développement post-natal de la SVZ et de la voie de migration rostrale (RMS) ainsi que chez l'adulte, une proportion significative de cellules astrogliales S100A1⁺

continue d'exprimer Mash1. Les cellules S100A1⁺ Mash1⁺ sont souvent isolées et représentent environ 6% ($5.8\% \pm 0.5$, n=347 cellules) du nombre de cellules Mash1⁺ dans la SVZ et la RMS. L'autre partie des cellules Mash1⁺ (94%) correspond à des cellules de type C et ont les caractéristiques phénotypiques suivantes : BrdU⁺ PSA-NCAM⁻ (Figure 21). Chez l'adulte, les astrocytes GFAP⁺ de la SVZ continuent à exprimer Mash1, toutefois ces cellules sont rare et toujours isolées (Figure 22B). En outre, nous avons aussi observé que dans la seconde zone germinative, au niveau de l'hippocampe, les astrocytes de la SGL pouvaient, là-aussi, exprimer de façon rare et transitoire le facteur de transcription Mash1 (Figure 22A).

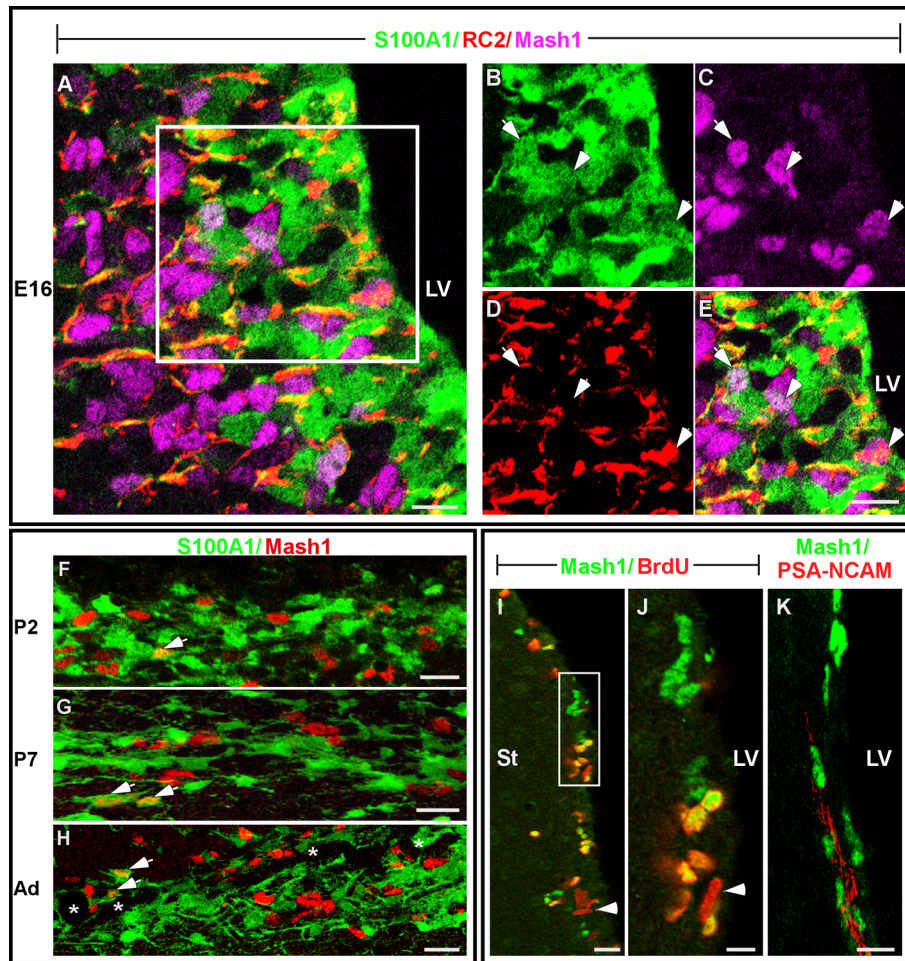


Figure 21 : Expression de Mash1 du développement embryonnaire au stade adulte.

A-E. Vue de la zone ventriculaire (VZ) striatale à E16. La majorité des cellules Mash1+ se situent dans la zone sous ventriculaire (SVZ), néanmoins, certaines cellules de la glie radiale S100A1+ expriment aussi Mash1. **F-H.** Coupes sagittales de la voie de migration rostrale (RMS) à différents temps de développement. Les flèches montrent la sous population de cellules astrogliales Mash1+/S100A1+ persistant dans cette zone. **I-J.** Coupe coronales chez l'adulte révélant que la majorité des cellules Mash1+ prolifèrent et sont regroupées en cluster. **K.** Chez l'adulte, les neuroblastes PSA-NCAM+ n'expriment pas Mash1. LV. ventricule latéral, St. striatum. Barre d'échelle: 20µm (A, I), 10µm (B-E, F-G, K).

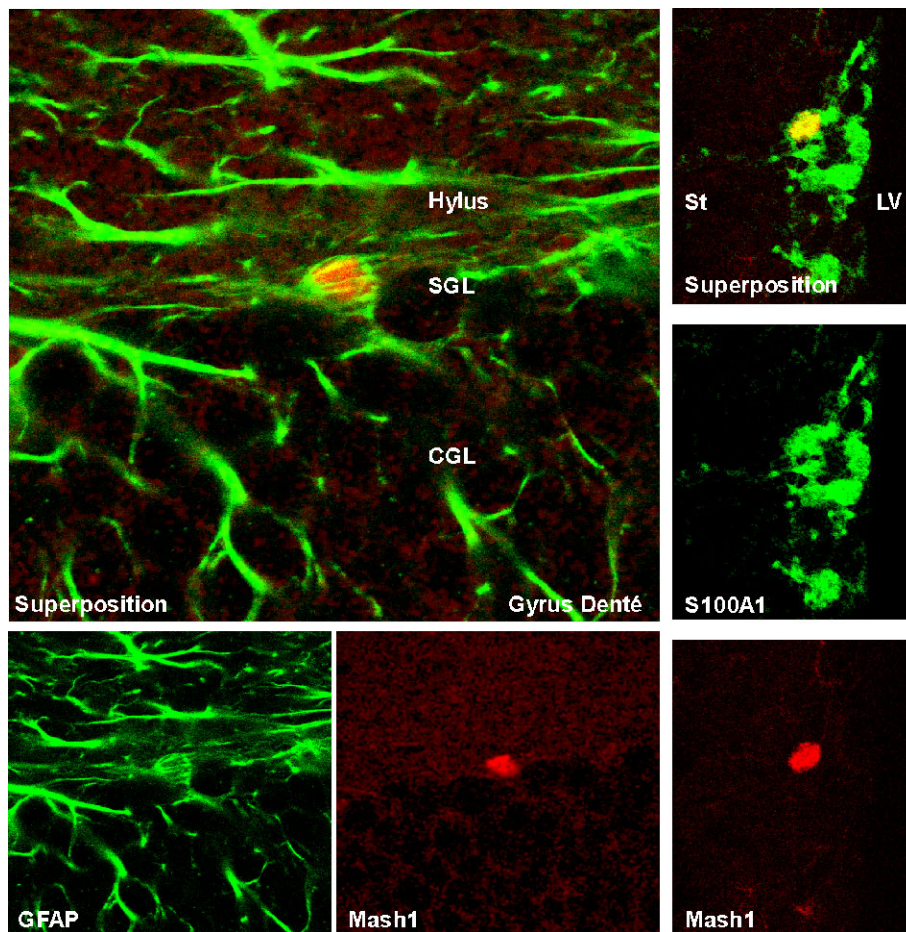


Figure 22: Expression de Mash1 dans les astrocytes des zones germinatives adultes.

Les astrocytes de la couche sous granulaire (SGL) de l'hippocampe (A) ou de la zone sous ventriculaire (B) peuvent exprimer le facteur de transcription bHLH Mash1. St. striatum, LV. ventricule latéral, CGL.couche de cellules granulaires

7.2.3 Expression de Mash1 après irradiation du SNC adulte

Nos résultats précédents démontrent que les cellules de la glie radiale puis les astrocytes des zones germinatives adultes expriment transitoirement le facteur de transcription Mash1. De plus, Mash1 est un facteur très précoce dans la spécification cellulaire (Bertrand et al., 2002). Ceci suggère que l'expression de Mash1 dans les astrocytes des zones germinatives pourrait être liée à leur activation. Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé d'activer la prolifération/différenciation des cellules souches astrocytaires en détruisant les cellules proliférantes de type C et A. Pour cela, nous avons soumis nos souris à une irradiation sub-léthale (8 Gy) par rayon gamma. Cette irradiation permet de détruire les cellules proliférantes mais préserve les cellules non proliférantes au cours de l'irradiation. Ensuite, les types C puis A réapparaissent et repeuplent cette zone (Figure 23).

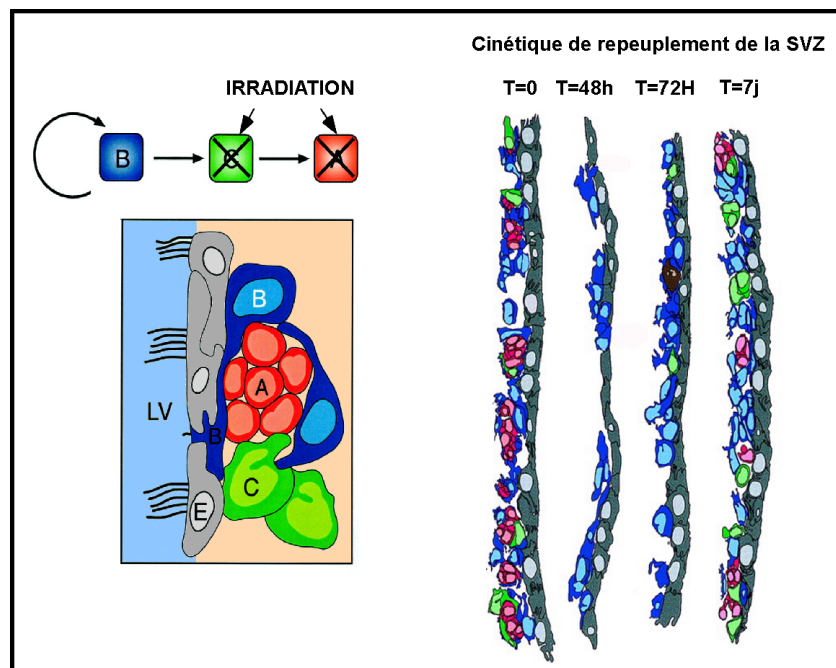


Figure 23. Modèle de déplétion des cellules proliférantes de la zone sous ventriculaire adulte.

Pour étudier les mécanismes moléculaires précoces se déroulant dans les cellules souches neurales, une déplétion des progéniteurs est réalisée par irradiation. Ceci induit une activation des cellules souches pour repeupler cette zone germinative. Des acteurs moléculaires sont ensuite caractérisés dans ces cellules. (modifié d'après Doetsch et al. 1997). Code couleur: Gris cellules épendymaires (E), Bleu cellules astrocytaires (Type B), Vert cellules à haut pouvoir prolifératif (Type C), Rouge neuroblastes (Type A). LV. ventricule latéral. (modifié d'après Doetsch et al., 1997).

Afin d'évaluer l'efficacité de la destruction puis de la repopulation des progéniteurs, nous avons sacrifié des animaux à 1, 2, 3 et 7 jours après irradiation (DPI). Ces animaux ont été préalablement injectés avec du BrdU 2 heures avant le sacrifice. Dans les souris non irradiées, 1300 cellules BrdU⁺ par mm² ont été comptabilisées sur le mur ventriculaire (1288±122, n=3 murs), ce qui correspond à environ 5000 cellules BrdU⁺ par murs (Figure 24A). En général, les cellules proliférantes sont retrouvées en cluster dense ou isolées. De nombreuses cellules bordent les vaisseaux sanguins (Figure 24A encart fenêtre). Cette observation est en accord avec d'autres travaux démontrant le lien entre la microvasculature et les cellules progénitrices de neurones (Monje et al., 2002). Un jour après irradiation, plus de 98% des cellules BrdU⁺ ont été éliminées. Le mur ventriculaire contient seulement quelques cellules BrdU isolées (Figure 24B). Deux et trois jours après irradiation, les cellules BrdU réapparaissent de façon uniforme tout le long du mur ventriculaire, soit isolées soit alignées le long de vaisseaux sanguins (Figure 24C encart). Sept jours après irradiation, les cellules BrdU sont retrouvées sur tout le mur et représentent 50% de la valeur contrôle (Figure 24D-E). Afin d'étudier le repeuplement de la SVZ suite à une irradiation, nous avons comparé la réapparition des cellules BrdU, Mash1 et PSA-NCAM dans la SVZ et la RMS à différents temps après irradiation. Un jour après irradiation, les cellules de type C et A, visualisés par Mash1, et PSA-NCAM respectivement, ont complètement disparus (Figure 24G,K,O). La présence de GFAP et de S100A1 ainsi que l'organisation des cellules épendymaires n'est pas affectée par l'irradiation (données non illustrées, Tada et al., 1999). Deux jours après irradiation, nous avons observé une augmentation importante du nombre de cellule Mash1⁺ comparé aux cellules BrdU⁺ (Figure 24H,L). Les cellules Mash1 ou BrdU se répartissent alors de façons isolées. Aucune cellule PSA-NCAM⁺ n'a pu être visualisées deux jours après irradiation, démontrant que la réapparition de cellules BrdU ou Mash1 précède la repopulation par les cellules de type A (Figure 24P). Sept jours après irradiation, la SVZ est partiellement revenue à la normale, et des chaînes de neuroblastes PSA-NCAM⁺ et des clusters de cellules Mash1⁺ et BrdU⁺ peuvent alors être observés (Figure 24I,M,Q).

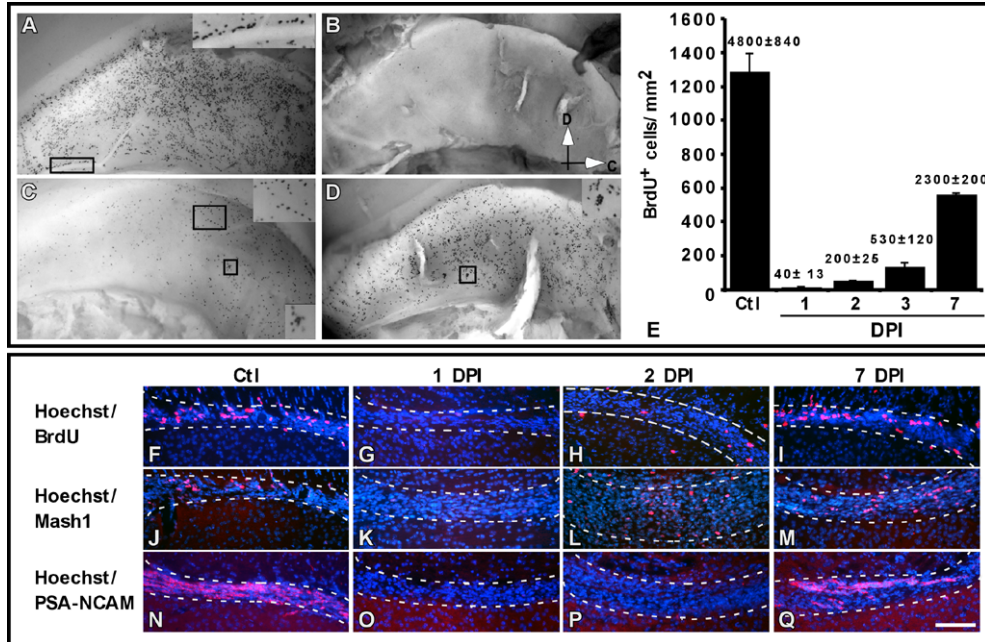


Figure 24. Time course du repeuplement de la zone sous ventriculaire (SVZ) et de la voie de migration rostrale (RMS) adulte après irradiation.

A-E. L'efficacité d'irradiation ainsi que le repeuplement de la SVZ a été étudié directement sur le mur ventriculaire disséqué. **A-D.** Marquage à la peroxydase représentatif des cellules proliférantes BrdU⁺ du mur ventriculaire à 0 (A), 1 (B), 3 (C) et 7 (D) jours après irradiation. **A-** Les cellules BrdU⁺ sont réparties tout au long du mur. Les cellules sont soit isolées soit en dense cluster. Elles sont aussi retrouvées alignées le long de vaisseaux (fenêtre). **B-** Disparition de la majorité des cellules proliférantes 1 jour après irradiation. **C-D,** Les cellules BrdU⁺ réapparaissent ensuite de façon alignée (C, fenêtre haut) puis en formant de petits clusters (C, fenêtre bas). Puis la densité de cellules BrdU⁺ et des cluster s'intensifie après 7 jours de récupération (D, fenêtre). **E-** Les cellules BrdU⁺ ont été comptées manuellement en utilisant l'application Axiovision. Les barres représentent le nombre de cellules positives rapportées au mm², ou en nombre absolu (nombre au dessus des barres). **F-Q.** time course du repeuplement de la RMS. Il est à noter que Mash1 réapparaît avant l'apparition du marquage BrdU (H, L). Barre d'échelle: 40µm.

Nous avons ensuite déterminé si les astrocytes germinatifs prolifèrent et/ou expriment Mash1 suite à une destruction des cellules de type C et A. Deux jours après irradiation, très peu de cellules prolifèrent ; cependant, plus de 85% des cellules BrdU⁺ expriment les marqueurs S100A1 et GFAP (Figure 25A). Ces résultats confirment que les premières cellules à proliférer sont bien les astrocytes.

La majorité des cellules Mash1⁺ (89.5%±4.35, n=312) (Figure 25D) correspondent aux astrocytes S100A1⁺. Cependant, et de façon intéressante, très peu d'astrocytes, qui expriment déjà Mash1⁺, ont incorporé la BrdU deux jours après irradiation (Figure 25G). Ceci démontre que l'expression de Mash1, dans les astrocytes de la SVZ et de la RMS, précède leur mitose et donc la production des cellules de type C.

Sept jours après irradiation, la proportion de cellules astrocytaires proliférantes diminue fortement (9.2±1.24%, n=658 cellules) (Figure 25B,C) démontrant l'activation transitoire des astrocytes. Cette diminution de l'activation est à corrélérer avec la forte diminution de cellules S100A1⁺ exprimant le facteur de transcription Mash1 (Figure 25E, F). Ceci suggère que l'expression de Mash1 dans les astrocytes est liée à leur capacité de proliférer et de produire des cellules de type C. Cependant, la proportion de cellules S100A1⁺ Mash1⁺ ainsi que S100A1⁺ BrdU⁺ est significativement plus élevée que dans le contrôle. Cette observation pourrait être liée au fait que la récupération de la neurogenèse est incomplète à sept jours. Cependant, ces résultats coïncident parfaitement avec la persistance d'un nombre d'astrocytes activés plus important après déplétion par la drogue Ara C (Ahn and Joyner, 2005).

L'expression de Mash1 chevauche sur une partie des cellules de type B et sur les cellules de type C ce qui suggère que ce facteur est impliqué dans les étapes précoces régulant la transition d'un type B à un type C. Cette hypothèse est supportée par nos expériences d'irradiation démontrant une expression massive de Mash1 dans les astrocytes quiescents avant le repeuplement de cette zone par les cellules de type C puis A. Ainsi, les astrocytes de type B exprimeraient Mash1 puis se diviseraient afin de donner naissance aux cellules de type C Mash1⁺ S100A1⁻ PSA-NCAM⁻.

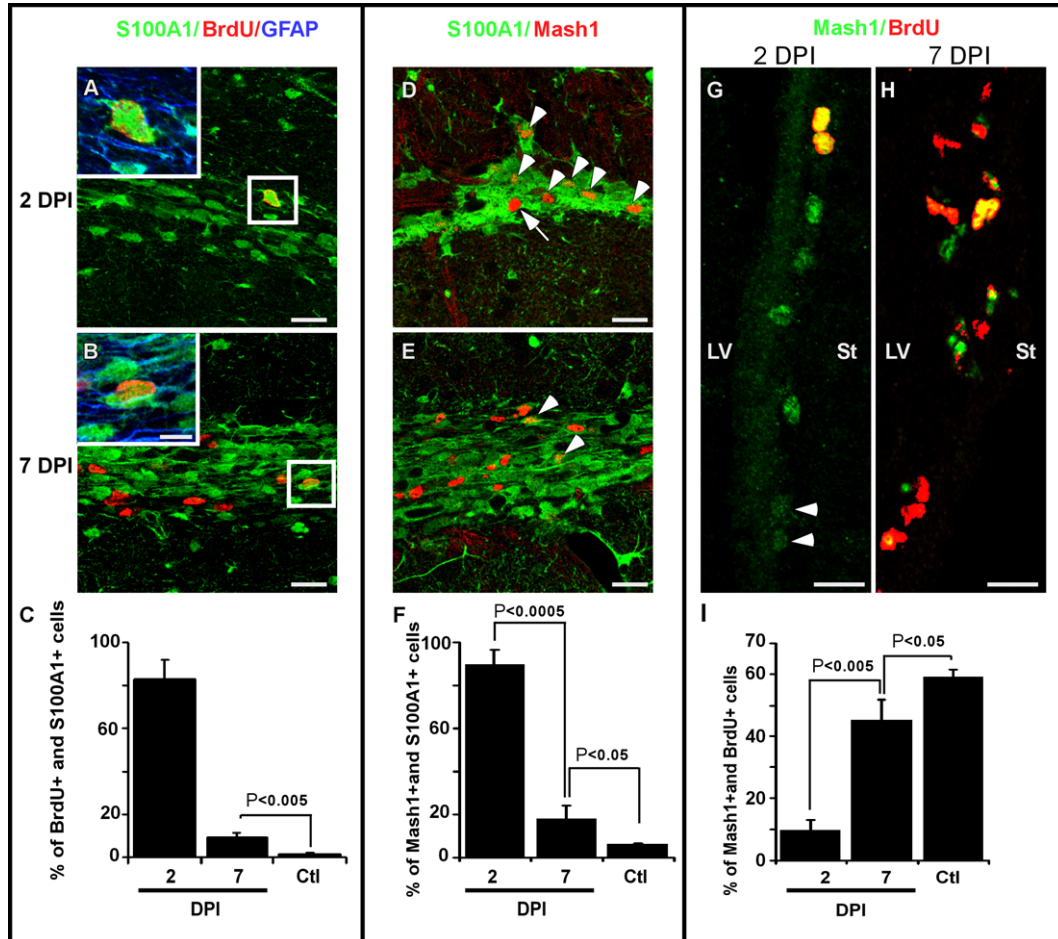


Figure 25 : Mash1 est massivement exprimé dans les astrocytes de type B consécutivement à une irradiation.

Des coupes sagittales (A-E) et coronales (G-H) ont été immunomarquées à 2 (A,D,G) et 7 (B,E,H) jours après irradiation. Les coupes sagittales ont été triplement marquées (A,B) avec S100A1 (vert), BrdU (rouge) et GFAP (bleu) ou doublement marquées (D et E) avec S100A1(vert) et Mash1 (rouge). Les coupes coronales adultes (G et H) ont été doublement marquées avec BrdU (rouge) et Mash1 (vert). Le pourcentage de cellules BrdU+S100A1+ (C), Mash1+S100A1+(F) et Mash1+BrdU+ (I) ont été établi à 0, 2 et 7 jours après irradiation. La barre d'erreurs indique l'écart type de 3 expériences indépendantes. Le test de student est indiqué. En D et E, la tête de flèche indique les cellules Mash1+S100A1+. En D, la flèche montre une cellule Mash1+S100A1- correspondant au type C qui réapparaissent. Barre échelle : 20 μ m et 10 μ m dans les encarts. L.V ventricule latéral ; St. Striatum.

7.2.4 Expression de Mash1 dans les astrocytes en culture et en neurosphère

Nous avons aussi réalisé des expériences à partir de cultures d'astrocytes et de neurosphères générées à partir de ces cultures. Ainsi, nous observons qu'*in vitro*, des astrocytes GLAST⁺ ou GFAP⁺ peuvent aussi exprimer le facteur de transcription Mash1 (Figure 26). Cependant, il est important de noter que la proportion d'astrocytes Mash1⁺ diminue avec le temps et qu'après 20-30 jours de cultures, l'expression de Mash1 devient indétectable dans ces cultures. Ce patron d'expression correspond parfaitement avec les phases de maturations des astrocytes observés dans l'article N°2.

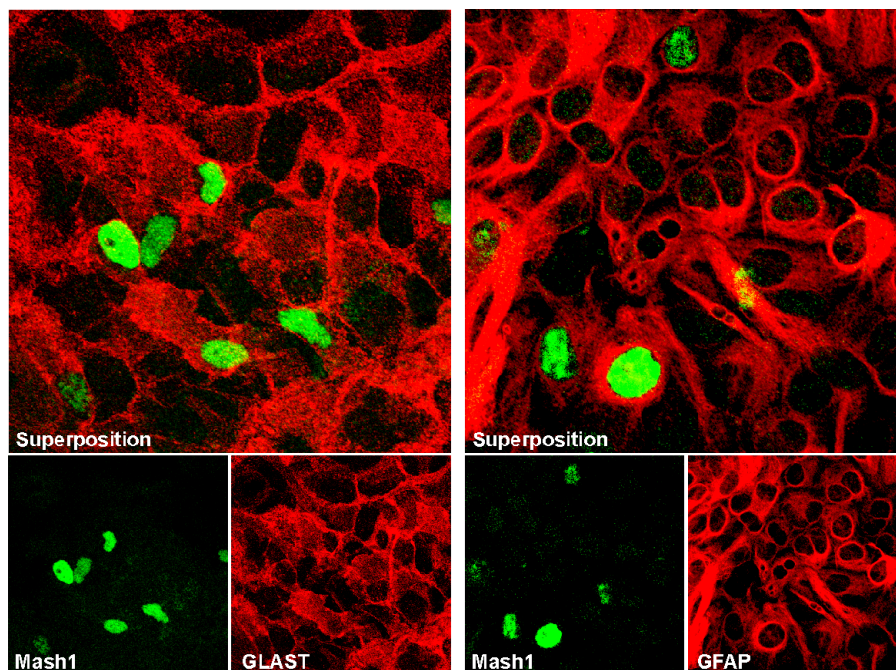


Figure 26: Culture d'astrocytes en monocouche.

Les astrocytes GLAST⁺ (A) ou GFAP⁺ (B) âgés de 15 jours peuvent exprimer le facteur de transcription bHLH Mash1.

Lorsque des neurosphères sont générées à partir de ces cultures, de nombreuses cellules S100A1⁻ expriment Mash1 et probablement correspondent à des cellules de type C (Figure 27). Cependant, quelques astrocytes S100A1⁺ au sein de la sphère expriment aussi Mash1. Nous avons notamment observé que le nombre de cellules S100A1⁺ Mash1⁺ était inversement proportionnelle à la taille de la sphère (Figure 27). Dans les jeunes sphères de petite taille (<20µm), les astrocytes sont très actifs et expriment souvent le facteur de transcription Mash1 (Figure 27A,D). Lorsque la sphère grandit (entre 20-50µm) le nombre d'astrocytes exprimant Mash1 devient beaucoup plus faible et le taux de Mash1 diminue dans ces cellules (Figure 27B,D). Enfin pour les plus grosses sphères (>50µm) la grande majorité des cellules S100A1⁺ n'expriment plus le facteur de transcription Mash1 (Figure 27C,D). Ces résultats démontrent que l'expression de Mash1 dans les astrocytes (en monocouche ou en sphère) est rare et très transitoire. Ils mettent aussi en évidence que la population de cellules proliférantes à l'intérieur de la sphère est hétérogène en types cellulaires et en facteurs de transcription. Au niveau de la neurosphère, la diminution de la proportion de cellules S100A1⁺ Mash1⁺ indique une baisse de l'activation de ces astrocytes. Cependant, ce résultat n'est absolument pas contradictoire avec l'idée que les cellules souches générant les sphères soient de nature astrocytaire, au contraire. En effet, Cindi Morshead et Derek Van der Kooy, ont récemment publié un modèle conduisant à la formation de neurosphères (Morshead and van der Kooy, 2004). Ainsi, la formation de neurosphères nécessite la survie et la prolifération des NSC puis des cellules progénitrices. Dès lors, la formation de la sphère résulte de la division de la NSC qui va générer quelques cellules filles (progénitrices) qui elles vont énormément proliférer et constituer la masse de la sphère. C'est pourquoi, plus les cellules filles sont produites et prolifèrent, plus les cellules souches diminuent leur prolifération et/ou activation. Ces résultats obtenus *in vitro*, supportent ceux obtenus *in vivo*, et suggèrent un rôle précoce de Mash1 pour l'activité de cellules souches.

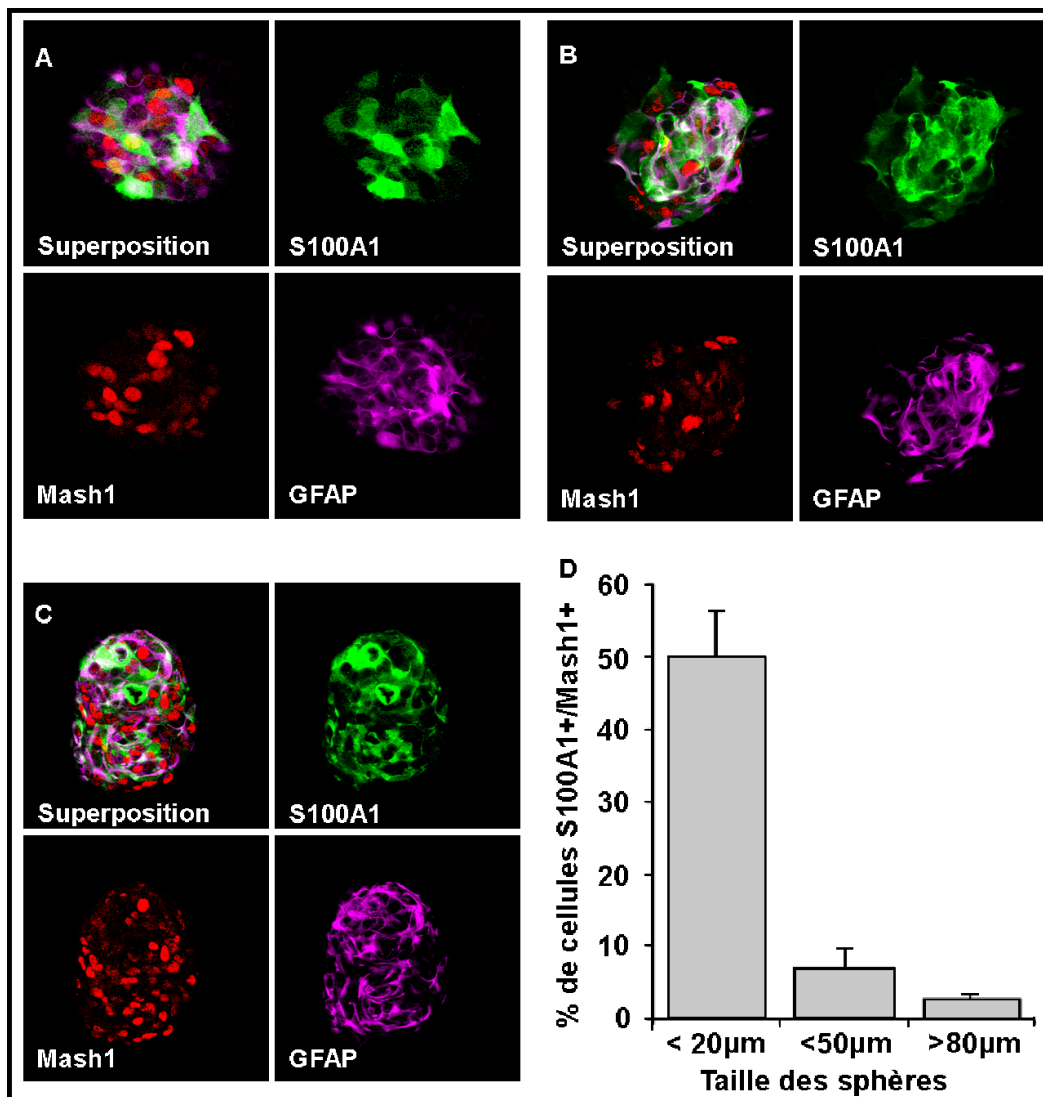


Figure 27 : Les astrocytes en neurosphères expriment transitoirement le facteur de transcription Mash1.

Lorsque la sphère commence à se développer, les astrocytes sont extrêmement actifs et expriment Mash1 (A, D). Au fur et à mesure que les cellules progénitrices sont produites et assurent le développement de la sphère, les astrocytes s'inactivent et expriment de moins en moins Mash1 (B,C,D).

7.2.5 Aspect fonctionnel de Mash1 : Mise au point de siRNA, de shRNA et de virus anti-Mash1.

7.2.5.1 siRNA et shRNA

Ces résultats descriptifs obtenus *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement un rôle de Mash1 dans l'activité de cellules souches des astrocytes immatures. Afin de valider cette hypothèse, il est essentiel d'aborder la fonction cellulaire de ce facteur de transcription dans ces astrocytes. La mutation nulle du gène Mash1 a déjà été réalisée . Cependant, elle conduit à la mort prématurée de l'animal juste après la naissance. De plus comme Mash1 s'exprime aussi dans les cellules de types C, l'observation de différences dans la formation des neurosphères ou même dans leur différenciation, ne pourra jamais être attribuée à leur fonction astrocytaire. C'est pourquoi, nous avons choisi d'altérer l'expression de Mash1 par la technique des siRNA puis des shRNA.

Tout d'abord nous avons généré trois séquences de siRNA pouvant potentiellement altérer l'expression de Mash1 de souris. Nous avons ensuite développé un modèle expérimental afin de tester leur efficacité d'action.

Séquences des différents siRNA :

siRNA 1

sens : 5'-GCA-CCA-AUG-UGU-CUU-ACU-U-3'

anti-sens: 5'-AAG-UAA-GAC-ACA-UUG-GUG-C-3'

siRNA 2

sens : 5'-CAA-GAG-CUG-CUG-GAC-UUU-A-3'

anti-sens : 5'-UAA-AGU-CCA-GCA-GCU-CUU-G-3'

siRNA3

sens : 5'-GAA-ACG-UGG-UUA-AUG-UAU-U-3'

anti-sens : 5'-AAU-ACA-UUA-ACC-ACG-UUU-C-3'

Afin de tester l'efficacité de nos différentes séquences de siRNA, nous avons développé un modèle expérimental de culture. C'est la lignée cellulaire Hela qui a été utilisée dans ce modèle. Cette lignée cellulaire a été choisie car les cellules se transfectent avec une très grande efficacité.

Tout d'abord, ces cellules Hela sont transfectées avec un plasmide contenant les séquences du gène codant pour la protéine Mash1 murine. Ensuite, ces cellules sont transfectées ou non avec chacune des différentes séquences de siRNA. La visualisation de la diminution de l'expression de Mash1 est alors visualisée par une marquage immunocytochimique (non illustré) ainsi que par western-blot (figure 26).

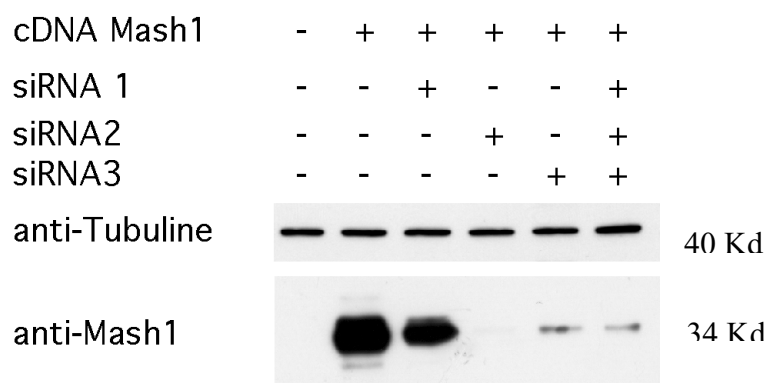


Figure 28 : Test de l'efficacité des siRNA anti Mash1 murin.

Des cellules Hela sont transfectées avec un plasmide contenant la séquence codante pour Mash1. Ensuite, les différents siRNA à tester sont transfectés dans ces mêmes cellules, soit individuellement soit ensemble.

Grâce à ces expériences, nous avons ainsi observé que la séquence de siRNA N°2 possédait la plus grande efficacité dans la diminution de l'expression de Mash 1. Disposant de cette séquence extrêmement efficace, nous souhaitons maintenant l'insérer dans un plasmide approprié afin 1) de diriger l'expression du shRNA sous le promoteur GFAP humain pour n'affecter que les cellules astrogliales (immatures et matures) 2) de visualiser les cellules transfectées grâce à la présence d'un gène rapporteur (de type GFP) dans ce plasmide et ceci pour mieux comparer le comportement de cellules souches des astrocytes transfectés avec la séquence anti-Mash1 ou avec un vecteur vide sans la séquence (contrôle).

7.2.5.2 Adénovirus anti Mash1 et perspectives expérimentales

Disposant de la séquence siRNA optimale, nous avons décidé d'insérer ces séquences dans un vecteur adénoviral. Dans le vecteur viral, les deux séquences (sens et anti-sens) sont reliées par une boucle en épingle à cheveux, ceci est appelé shRNA (*short hairpin RNA*). La séquence shRNA se retrouvera sous le contrôle du promoteur GFAP humain (*hGFAP*) afin d'induire une extinction du gène cible uniquement dans les cellules astrogliales. En outre, le vecteur viral codera aussi pour un gène rapporteur fluorescent (GFP) permettant de visualiser et d'isoler les cellules infectées. Cette construction (en cours d'élaboration) permettra d'étudier *in vitro* et *in vivo*, l'effet de l'inhibition de Mash1 dans les astrocytes.

7.2.5.2.1 Etudes in vitro

Afin d'étudier le rôle de Mash1, *in vitro*, des cultures pures d'astrocytes seront réalisées à partir de souriceaux nouveaux-nés (voir matériel et méthodes article N°2). Ces cultures, seront ensuite infectées ou transfectées avec le shRNA. Les astrocytes infectés/transfectés seront triés par FACS et comparés à ceux non infectés/transfectés, notamment dans leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, en utilisant le système, *in vitro*, de neurosphères.

De plus, un nouveau modèle de culture, récemment décrit, permet de récapituler *in vitro* les différentes étapes de la neurogenèse à partir de cultures d'astrocytes (Scheffler et al., 2005). En infectant les astrocytes, nous serons aussi en

mesure d'étudier directement, *in vitro*, l'effet de l'inhibition de Mash1 dans les astrocytes sur la neurogenèse.

7.2.5.2.2 Etudes in vivo

Disposant d'un adénovirus contenant la séquence shRNA anti Mash1 sous le promoteur *hGFAP*, nous pourrons ensuite étudier le rôle de cette protéine, *in vivo*. Pour cela, les vecteurs viraux seront injectés de façon stéréotaxique au niveau de la zone sous ventriculaire. Ce type de vecteur a en effet été démontré comme infectant préférentiellement les astrocytes dans cette zone (Liu et al., 2005).

Après cette injection, les souris seront alors soumises ou non à une irradiation gamma afin de détruire les cellules proliférantes de cette zone, c'est-à-dire principalement les cellules de type C et A. Ensuite, nous observerons si l'infection des astrocytes induit une perturbation dans la réponse proliférative de ces cellules, ou si elle conduit à des modifications dans la spécification des cellules de type C qui en sont issus. Pour cela, des études immunohistochimiques seront alors réalisées à différents temps après l'infection.

CONCLUSION

8 Conclusion et Perspectives

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressé au lien existant entre la maturation des cellules gliales et leur potentialité de différenciation. Nous avons tout d'abord étudié l'expression spatio-temporelle de la protéine S100B dans la lignée oligodendrocytaire. Ainsi, nous avons démontré que cette protéine s'exprime dans les cellules progénitrices oligodendrogiales (OPC), cellules produites au cours du développement embryonnaire et post-natal. Leur maturation va ensuite conduire à la formation de cellules gliales spécialisées : les oligodendrocytes qui sont les cellules myélinisantes du système nerveux central (SNC). De façon intéressante, certains OPC ne se différencient pas au cours de l'oligodendrogenèse développementale et persistent chez l'adulte. Au cours du développement, les OPC voient leur potentiel de différenciation cellulaire se restreindre. Alors que les OPC péri-natales sont capables *in vivo* et *in vitro* de se différencier en plusieurs types cellulaires, les OPC dites "adultes" sont, elles, devenues unipotentes. Au cours de notre étude, nous avons observé que la protéine S100B s'exprimait dans les OPC restreint dans la voie oligodendrogliale, aussi bien en culture qu'*in vivo*. D'autre part, son expression corrèle parfaitement avec les diverses étapes de maturation dans le lignage oligodendrocytaire. Afin de tester le rôle de cette protéine dans cette maturation oligodendrogliale, nous avons utilisées des souris invalidées pour le gène codant pour la protéine S100B. Nos études ont alors démontré un rôle de cette protéine dans la régulation de la maturation de ces cellules.

L'absence de phénotype majeur dans l'oligodendrogenèse des souris invalidées pour le gène *s100b*, nous a conduit, dans un second temps, à déterminer si d'autres calciprotéines, structuralement proche, pouvaient compenser la fonction de la protéine S100B dans la lignée oligodendrocytaire. La protéine S100A1 était un bon candidat, car elle est exprimée dans le SNC, elle est extrêmement proche de la S100B et elle peut s'hétérodimériser avec la protéine S100B. Nos études *in vitro* et *in vivo* ont démontré un patron d'expression identique dans les cellules oligodendrogiales en voie de maturation. Cependant, et contrairement à la S100B, l'expression de l'isoforme S100A1 est plus précoce dans ce lignage et est indépendante de la maturation cellulaire. Ceci suppose une possible fonction

compensatoire au cours de la maturation, mais aussi des fonctions précoces et propres à la protéine S100A1.

Afin d'étudier cette possible compensation fonctionnelle, nous venons de générer des souris doublement invalidées pour les gènes *s100a1* et *s100b*. Aucun phénotype majeur n'a malheureusement pu être observé en condition physiologique, néanmoins, des résultats préliminaires suggèrent des réponses cellulaires différentes suite à un stress démyélinisant chez l'adulte. Un phénotype dans l'oligodendrogenèse adulte suite à un stress mais pas au cours du développement embryonnaire ou en condition physiologique a déjà été observé pour d'autres souris génétiquement modifiées (Mason et al., 2003). Des investigations plus précises en condition pathologiques doivent être et seront réalisées au sein du laboratoire, afin de déterminer les événements conduisant à ces différences de réponses cellulaires suite à une démyélinisation chez l'adulte.

Dans une deuxième partie de la thèse, nous nous sommes intéressé au lien pouvant exister entre les calciprotéines S100A1 et S100B, les stades de maturations des cellules astrogliales et leur potentialité de différenciation chez la souris adulte.

Chez l'adulte une neurogenèse persiste dans des zones très restreintes du télencéphale : la zone sous ventriculaire (SVZ) et la zone sous granulaire de l'hippocampe (SGL). Dans les deux cas, les cellules souches adultes du système nerveux central (SNC) ont été décrites comme possédant les caractéristiques phénotypiques et ultra structurales des cellules astrogliales. Ces observations modifient totalement notre perception des cellules astrocytaires du SNC, néanmoins, tous les astrocytes adultes ne possèdent pas des propriétés de différenciation multiples. En effet, si les cellules astrocytaires GFAP⁺ du télencéphale possèdent les caractéristiques de cellules souches au cours du développement post-natal, seuls ceux des zones germinatives les conservent chez l'adulte. Cependant les mécanismes permettant aux astrocytes de conserver leurs propriétés germinatives chez l'adulte sont encore totalement inconnus.

La notion de cellule souche, fait souvent référence à une cellule indifférenciée. Les cellules souches neurales dérogent à cette règle en présentant des caractéristiques de cellules astrogliales différenciées. C'est pourquoi, il a été émis

comme hypothèse que ces cellules devaient être dans un état d'immaturité non caractérisé.

Dans ce deuxième travail, nous avons cherché à déterminer si l'expression des protéines S100A1 et S100B pouvait distinguer différents stades de maturation des cellules astrogliales en relation avec leur potentiel de différenciation cellulaire, comme nous l'avons vu pour les cellules oligodendrocytaires. Pour cela nous avons étudié le profil d'expression de ces deux protéines au cours de la gliogenèse du télencéphale. Nous avons ainsi observé que la S100A1 est un marqueur très précoce du lignage astroglial, alors que la S100B apparaît bien après l'expression de la protéine GFAP dans des astrocytes donc plus mature, *in vitro* et *in vivo*. En outre, l'absence d'apparition de la protéine S100B dans les astrocytes de la SVZ, *in vivo* mais pas *in vitro*, suggère que ceux-ci sont maintenus dans un état immature. Afin de déterminer si ce maintien dans un état immature est essentiel pour qu'un astrocyte conserve ses propriétés de cellules souches, nous avons décidé d'utiliser une souris transgénique exprimant l'EGFP sous les séquences promotrices du gène *s100b* murin. Après tri par cytométrie en flux des cellules astrocytaires EGFP négatives ou positives, nous avons pu démontrer que d'une part la transition d'un stade immature vers un stade mature est irréversible et d'autre part résulte en la perte de leurs propriétés de cellules souches neurales. De plus, nous avons pu démontrer un rôle du microenvironnement de la SVZ adulte dans le maintien de l'état immature des astrocytes. Finalement, nous avons identifié le facteur de croissance EGF, comme un acteur extracellulaire maintenant, *in vitro* et *in vivo*, les astrocytes du télencéphale dans un état immature.

Toutes ces données suggèrent que les astrocytes des zones germinatives adultes conservent leur propriétés de cellules souches neurales en étant maintenus dans un état d'astrocytes immatures grâce à des signaux environnementaux, notamment l'EGF.

Finalement, nous avons cherché à déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans l'activation des astrocytes germinatifs. Nous avons ainsi pu identifier le facteur de transcription Mash1 comme s'exprimant de l'embryon à l'adulte dans les cellules gliales de la SVZ. En outre, lorsque ces cellules sont activées pour recoloniser cette zone, suite à une déplétion des progéniteurs, les astrocytes induisent massivement l'expression de mash1. Finalement, nous avons

aussi observé qu'*in vitro*, les astrocytes en monocouche ou en sphères expriment Mash1.

Actuellement, l'expression et donc la fonction de Mash1 dans les astrocytes est inconnue. Afin d'aborder le rôle de Mash1 dans l'activation des cellules souches neurales astrocytaires, nous avons développé une séquence de siRNA inhibant l'expression de Mash1. Les perspectives de ce travail sont d'élaborer un vecteur adénoviral contrôlant l'expression du shRNA sous un promoteur spécifique des cellules astrocytaires. Ensuite, il faudra déterminer *in vitro* et *in vivo*, l'implication de cette protéine dans la prolifération, la différenciation et la spécification de ces cellules souches neurales astrocytaires.

La découverte des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des cellules souches neurales adultes est indispensable si l'on veut, dans le futur, utiliser ces cellules dans le cadre de thérapies régénératives.

REFERENCES

9 References:

A

Aguirre, A. and Gallo, V. (2004). Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* **24**, 10530-41.

Aguirre, A. A., Chittajallu, R., Belachew, S. and Gallo, V. (2004). NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* **165**, 575-89.

Ahn, S. and Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894-7.

Alexanian, A. R., Bamburg, J. R., Hidaka, H. and Mornet, D. (2001). Calcium-dependent regulation of interactions of caldesmon with calcium-binding proteins found in growth cones of chick forebrain neurons. *Cell Mol Neurobiol* **21**, 437-51.

Allen, E. (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **22**, 547-568.

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* **135**, 1127-8.

Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* **145**, 573-91.

Altman, J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* **16**, 263-78.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **137**, 433-57.

Altman, J. and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-35.

Altman, J. and Das, G. D. (1970). Postnatal changes in the concentration and distribution of cholinesterase in the cerebellar cortex of rats. *Exp Neurol* **28**, 11-34.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**, 287-93.

Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-6.

Alvarez-Buylla, A., Seri, B., and Doetsch, F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin* **57**, 751-758.

Anderson, D.J. (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* **30**, 19-35.

Andrae, J., Hansson, I., Afink, G. B. and Nister, M. (2001). Platelet-derived growth factor receptor- α in ventricular zone cells and in developing neurons. *Mol Cell Neurosci* **17**, 1001-13.

Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. and Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**, 881-90.

B

Bansal, R., Kumar, M., Murray, K., Morrison, R. S. and Pfeiffer, S. E. (1996). Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci* **7**, 263-75.

Barger, S. W. and Van Eldik, L. J. (1992). S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem* **267**, 9689-94.

Barger, S. W., Van Eldik, L. J. and Mattson, M. P. (1995). S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res* **677**, 167-70.

Baudier, J., Bergeret, E., Bertacchi, N., Weintraub, H., Gagnon, J. and Garin, J. (1995). Interactions of myogenic bHLH transcription factors with calcium-binding calmodulin and S100a (alpha alpha) proteins. *Biochemistry* **34**, 7834-46.

Baudier, J. and Cole, R. D. (1989). The Ca^{2+} -binding sequence in bovine brain S100b protein beta-subunit. A spectroscopic study. *Biochem J* **264**, 79-85.

Baudier, J. and Gerard, D. (1986). Ions binding to S100 proteins. II. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. *J Biol Chem* **261**, 8204-12.

Baudier, J., Glasser, N. and Gerard, D. (1986). Ions binding to S100 proteins. I. Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 alpha alpha, S100a (alpha beta), and S100b (beta beta) protein: Zn^{2+} regulates Ca^{2+} binding on S100b protein. *J Biol Chem* **261**, 8192-203.

Baudier, J., Mochly-Rosen, D., Newton, A., Lee, S. H., Koshland, D. E., Jr. and Cole, R. D. (1987). Comparison of S100b protein with calmodulin: interactions with

melittin and microtubule-associated tau proteins and inhibition of phosphorylation of tau proteins by protein kinase C. *Biochemistry* **26**, 2886-93.

Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.

Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, A. A., Yuan, X., Kirby, M., Anderson, S. and Gallo, V. (2003). Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* **161**, 169-86.

Bentivoglio, M. and Mazzarello, P. (1999). The history of radial glia. *Brain Res Bull* **49**, 305-15.

Berry, M., Hubbard, P. and Butt, A. M. (2002). Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* **31**, 457-67.

Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.

Bignami, A. and Dahl, D. (1974). Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* **252**, 55-6.

Birling, M. C. and Price, J. (1998). A study of the potential of the embryonic rat telencephalon to generate oligodendrocytes. *Dev Biol* **193**, 100-13.

Buniatian, G., Traub, P., Albinus, M., Beckers, G., Buchmann, A., Gebhardt, R. and Osswald, H. (1998). The immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein in mesangial cells and podocytes of the glomeruli of rat kidney in vivo and in culture. *Biol Cell* **90**, 53-61.

Burd, G. D. and Nottebohm, F. (1985). Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol* **240**, 143-52.

Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H. and Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297-308.

Butt, A. M., Kiff, J., Hubbard, P. and Berry, M. (2002). Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* **31**, 551-65.

C

Cabrera, C. V. and Alonso, M. C. (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 2965-73.

- Cai, J., Qi, Y., Hu, X., Tan, M., Liu, Z., Zhang, J., Li, Q., Sander, M. and Qiu, M.** (2005). Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of *Nkx6* regulation and *Shh* signaling. *Neuron* **45**, 41-53.
- Calver, A. R., Hall, A. C., Yu, W. P., Walsh, F. S., Heath, J. K., Betsholtz, C. and Richardson, W. D.** (1998). Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* **20**, 869-82.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S. and Gould, E.** (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-44.
- Campbell, A.** (2002). The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 2**, 17-20.
- Campbell, K. and Gotz, M.** (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* **25**, 235-8.
- Casarosa, S., Fode, C. and Guillemot, F.** (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-34.
- Chambers, C. B., Peng, Y., Nguyen, H., Gaiano, N., Fishell, G. and Nye, J. S.** (2001). Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* **128**, 689-702.
- Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M. and van der Kooy, D.** (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* **19**, 4462-71.
- Chittajallu, R., Aguirre, A. and Gallo, V.** (2004). NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* **561**, 109-22.
- Choi, B. H. and Lapham, L. W.** (1978). Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res* **148**, 295-311.
- Chouaf, L., Didier-Bazes, M., Hardin, H., Aguera, M., Fevre-Montange, M., Voutsinos, B. and Belin, M. F.** (1991). Developmental expression of glial markers in ependymocytes of the rat subcommissural organ: role of the environment. *Cell Tissue Res* **266**, 553-61.
- Cocchia, D.** (1981). Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* **214**, 529-40.
- Cochran, A. J., Lu, H. F., Li, P. X., Saxton, R. and Wen, D. R.** (1993). S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. *Melanoma Res* **3**, 325-30.

Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. and Alvarez-Buylla, A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* **3**, 1091-7.

Console, G. M., Jurado, S. B., Riccillo, F. L. and Gomez Dumm, C. L. (2000). Immunohistochemical and ultrastructural study of pituitary folliculostellate cells during aging in rats. *Cells Tissues Organs* **167**, 25-32.

Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., and Van der Kooy, D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell population in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**, 2649-2658.

Culican, S. M., Baumrind, N. L., Yamamoto, M. and Pearlman, A. L. (1990). Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J Neurosci* **10**, 684-92.

D

Das, A., Pansky, B., Budd, G. C. and Kollarits, C. R. (1984). Immunocytochemistry of mouse and human retina with antisera to insulin and S-100 protein. *Curr Eye Res* **3**, 1397-403.

Davey, G. E., Murmann, P. and Heizmann, C. W. (2001). Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* **276**, 30819-26.

Dawson, M. R., Levine, J. M. and Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* **61**, 471-9.

Deloulme, J. C., Assard, N., Mbele, G. O., Mangin, C., Kuwano, R. and Baudier, J. (2000). S100A6 and S100A11 are specific targets of the calcium- and zinc-binding S100B protein in vivo. *J Biol Chem* **275**, 35302-10.

Deloulme, J. C., Raponi, E., Gentil, B. J., Bertacchi, N., Marks, A., Labourdette, G. and Baudier, J. (2004). Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* **27**, 453-65.

Delphin, C., Ronjat, M., Deloulme, J. C., Garin, G., Debussche, L., Higashimoto, Y., Sakaguchi, K. and Baudier, J. (1999). Calcium-dependent interaction of S100B with the C-terminal domain of the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* **274**, 10539-44.

Deng, W. and Poretz, R. D. (2003). Oligodendroglia in developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* **24**, 161-78.

Diers-Fenger, M., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., Levine, J. M. and Trotter, J. (2001). AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia. *Glia* **34**, 213-28.

- Doetsch, F.** (2003a). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* **6**, 1127-34.
- Doetsch, F.** (2003b). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-50.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-61.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11619-24.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**, 1021-34.
- Donato, R.** (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-68.
- Du, X. J., Cole, T. J., Tennis, N., Gao, X. M., Kontgen, F., Kemp, B. E. and Heierhorst, J.** (2002). Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1-deficient mice. *Mol Cell Biol* **22**, 2821-9.
- Dubois-Dalcq, M. and Murray, K.** (2000). Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol Biol (Paris)* **48**, 80-6.
- Duda, T., Koch, K. W., Venkataraman, V., Lange, C., Beyermann, M. and Sharma, R. K.** (2002). Ca(2+) sensor S100beta-modulated sites of membrane guanylate cyclase in the photoreceptor-bipolar synapse. *Embo J* **21**, 2547-56.

E

- Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G. and Macklis, J. D.** (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* **75**, 321-41.
- Eriksen, J. L. and Druse, M. J.** (2001). Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain Res Dev Brain Res* **131**, 9-15.

F

- Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Baratta, J., Korc, M., Endo, T.L., Duond, A., Nguyen, G., et al.** (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 14686-14691.

Feng, L., Hatten, M. E. and Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895-908.

Ffrench-Constant, C. and Raff, M. C. (1986). Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* **319**, 499-502.

Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. and Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **23**, 373-82.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J. and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* **14**, 67-80.

Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A. C., Abramsson, A., Calver, A. R., Bostrom, H., Willetts, K., Bertold, C. H., Heath, J. K., Betsholtz, C. et al. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* **126**, 457-67.

Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Hiroshide, T., Nakafuku, M., Richardson, W. and Qiu, M. (2002). Dual origin of spinal cord oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of *Olig2* and *Nkx2.2* in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* **129**, 681-693.

G

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-8.

Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A. and Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* **36**, 249-66.

Gage, F. H. and Verma, I. M. (2003). Stem cells at the dawn of the 21st century. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11817-8.

Gaiano, N., Nye, J. S. and Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404.

Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L. and Vescovi, A. L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ Res* **92**, 598-608.

Garbuglia, M., Verzini, M., Rustandi, R. R., Osterloh, D., Weber, D. J., Gerke, V. and Donato, R. (1999a). Role of the C-terminal extension in the interaction of S100A1 with GFAP, tubulin, the S100A1- and S100B-inhibitory peptide, TRTK-12, and a peptide derived from p53, and the S100A1 inhibitory effect on GFAP polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 36-41.

- Garbuglia, M., Verzini, M., Sorci, G., Bianchi, R., Giambanco, I., Agneletti, A. L. and Donato, R.** (1999b). The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1177-85.
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G. and Sofroniew, M. V.** (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1233-41.
- Garcia-Verdugo, J. M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E. and Font, E.** (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* **57**, 765-75.
- Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A. and French-Constant, C.** (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* **131**, 3423-32.
- Goldman, S. A. and Nottebohm, F.** (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2390-4.
- Gomez, L. A., Brusco, A. and Saavedra, J. P.** (1990). Immunocytochemical study of S-100 positive glial cells in the brainstem and spinal cord of the rat embryo. *Int J Dev Neurosci* **8**, 55-64.
- Goncalves, D. S., Lenz, G., Karl, J., Goncalves, C. A. and Rodnight, R.** (2000). Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport* **11**, 807-9.
- Gotz, M., Hartfuss, E. and Malatesta, P.** (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* **57**, 777-88.
- Gotz, M. and Steindler, D.** (2003). To be glial or not-how glial are the precursors of neurons in development and adulthood? *Glia* **43**, 1-3.
- Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G. and Fuchs, E.** (1999a). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5263-7.
- Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S. and Gross, C. G.** (1999b). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* **286**, 548-52.
- Gregg C. and Weiss, S.** (2003). Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **37**, 11587-11601.
- Greenwood, K. and Butt, A. M.** (2003). Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival. *Mol Cell Neurosci* **23**, 544-58.

Gregori, N., Proschel, C., Noble, M. and Mayer-Proschel, M. (2002). The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. *J Neurosci* **22**, 248-56.

Griffin, W. S., Sheng, J. G., McKenzie, J. E., Royston, M. C., Gentleman, S. M., Brumback, R. A., Cork, L. C., Del Bigio, M. R., Roberts, G. W. and Mrak, R. E. (1998). Life-long overexpression of S100beta in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* **19**, 401-5.

Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7611-5.

Griffin, W. S., Yeralan, O., Sheng, J. G., Boop, F. A., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Burnett, B. A., Feoktistova, A. and Van Eldik, L. J. (1995). Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* **65**, 228-33.

Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R. and Vescovi, A. L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **19**, 3287-97.

Guo, L., Sawkar, A., Zasadzki, M., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J. (2001). Similar activation of glial cultures from different rat brain regions by neuroinflammatory stimuli and downregulation of the activation by a new class of small molecule ligands. *Neurobiol Aging* **22**, 975-81.

H

Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V. and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* **51**, 81-97.

Hack, M. A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P. M. and Gotz, M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 865-72.

Hack, M. A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M. and Gotz, M. (2004). Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci* **25**, 664-78.

- Hajihosseini, M., Tham, T. N. and Dubois-Dalcq, M.** (1996). Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *J Neurosci* **16**, 7981-94.
- Hall, A., Giese, N. A. and Richardson, W. D.** (1996). Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* **122**, 4085-94.
- Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T. and Hidaka, H.** (1983). Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **401**, 237-49.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. and Gotz, M.** (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* **229**, 15-30.
- Heierhorst, J., Kobe, B., Feil, S. C., Parker, M. W., Benian, G. M., Weiss, K. R. and Kemp, B. E.** (1996). Ca²⁺/S100 regulation of giant protein kinases. *Nature* **380**, 636-9.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A. and Gotz, M.** (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* **5**, 308-15.
- Heizmann, C. W. and Cox, J. A.** (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* **11**, 383-97.
- Herrera, J., Yang, H., Zhang, S. C., Proschel, C., Tresco, P., Duncan, I. D., Luskin, M. and Mayer-Proschel, M.** (2001). Embryonic-derived glial-restricted precursor cells (GRP cells) can differentiate into astrocytes and oligodendrocytes in vivo. *Exp Neurol* **171**, 11-21.
- Holland, E. C. and Varmus, H. E.** (1998). Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1218-23.
- Horton, S., Meredith, A., Richardson, J. A. and Johnson, J. E.** (1999). Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* **14**, 355-69.
- Hu, J., Castets, F., Guevara, J. L. and Van Eldik, L. J.** (1996). S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* **271**, 2543-7.
- Hunter, K. E. and Hatten, M. E.** (1995). Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2061-5.
- Hunter, M. J. and Chazin, W. J.** (1998). High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* **273**, 12427-35.

Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R. and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* **275**, 40096-105.

I

Ikura, M., Osawa, M. and Ames, J. B. (2002). The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* **24**, 625-36.

Imura, T., Kornblum, H. I. and Sofroniew, M. V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* **23**, 2824-32.

Irvin, D. K., Zurcher, S. D., Nguyen, T., Weinmaster, G. and Kornblum, H. I. (2001). Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol* **436**, 167-81.

Isobe, T., Ishioka, N. and Okuyama, T. (1981). Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem* **115**, 469-74.

Isobe, T., Nakajima, T. and Okuyama, T. (1977). Reinvestigation of extremely acidic proteins in bovine brain. *Biochim Biophys Acta* **494**, 222-32.

Isobe, T., Takahashi, K. and Okuyama, T. (1984). S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem* **43**, 1494-6.

Isobe, T., Tsugita, A. and Okuyama, T. (1978). The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b). *J Neurochem* **30**, 921-3.

J

Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34.

Johnson, J. E., Birren, S. J., Saito, T. and Anderson, D. J. (1992). DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3596-600.

K

Kahn, H. J., Bauman, R., Van Eldik, L. J., Dunn, R. J. and Marks, A. (1991). Immunoreactivity of S100 beta in heart, skeletal muscle, and kidney in chronic lung disease: possible induction by cAMP. *Mod Pathol* **4**, 698-701.

Kahn, M. A., Ellison, J. A., Chang, R. P., Speight, G. J. and de Vellis, J. (1997). CNTF induces GFAP in a S-100 alpha brain cell population: the pattern of CNTF-alpha R suggests an indirect mode of action. *Brain Res Dev Brain Res* **98**, 221-33.

Kalman, M., Szekely, A. D. and Csillag, A. (1998). Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood. *Anat Embryol (Berl)* **198**, 213-35.

Kaplan, M. S. and Bell, D. H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* **4**, 1429-41.

Kempermann, G. and Gage, F. H. (2000). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* **231**, 220-35; discussion 235-41, 302-6.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* **27**, 447-52.

Kiewitz, R., Lyons, G. E., Schafer, B. W. and Heizmann, C. W. (2000). Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 207-19.

Kligman, D. and Hilt, D. C. (1988). The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* **13**, 437-43.

Kligman, D. and Marshak, D. R. (1985). Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7136-9.

Kohwi, M., Osumi, N., Rubenstein, J. L. and Alvarez-Buylla, A. (2005). Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* **25**, 6997-7003.

Kriegstein, A. R. and Gotz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* **43**, 37-43.

Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., and Gage, F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**, 5820-5829.

L

Labourdette, G. and Mandel, P. (1980). Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 1702-9.

Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., Schaffer, D.V. (2003). Sonic Hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature Neurosci.* **6**, 21-27.

Lam, A. G., Koppal, T., Akama, K. T., Guo, L., Craft, J. M., Samy, B., Schavocky, J. P., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J. (2001). Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging* **22**, 765-72.

Landar, A., Caddell, G., Chessher, J. and Zimmer, D. B. (1996). Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* **20**, 279-85.

Landry, C. F., Ivy, G. O., Dunn, R. J., Marks, A. and Brown, I. R. (1989). Expression of the gene encoding the beta-subunit of S-100 protein in the developing rat brain analyzed by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* **6**, 251-62.

Landry, C. F., Youson, J. H. and Brown, I. R. (1990). Expression of the beta-S100 gene in brain and craniofacial cartilage of the embryonic rat. *Dev Neurosci* **12**, 225-34.

Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C. and Steindler, D. A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13883-8.

Lee, J. C., Mayer-Proschel, M. and Rao, M. S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* **30**, 105-21.

Levine, J. M. and Stallcup, W. B. (1987). Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen. *J Neurosci* **7**, 2721-31.

Levine, J. M., Stincone, F. and Lee, Y. S. (1993). Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. *Glia* **7**, 307-21.

Levison, S. W., Chuang, C., Abramson, B. J. and Goldman, J. E. (1993). The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* **119**, 611-22.

Levison, S. W. and Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10**, 201-12.

Levitt, P. and Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* **193**, 815-40.

Levy, R., Shohat, L. and Solomon, B. (1998). Specificity of an anti-aluminium monoclonal antibody toward free and protein-bound aluminium. *J Inorg Biochem* **69**, 159-63.

- Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7526-31.
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**, 713-26.
- Liu, G., Martins, I. H., Chiorini, J. A. and Davidson, B. L.** (2005). Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther* **12**, 1503-8.
- Liu, Y. and Rao, M. S.** (2004). Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell* **96**, 279-90.
- Liu, Y., Wu, Y., Lee, J. C., Xue, H., Pevny, L. H., Kaprielian, Z. and Rao, M. S.** (2002). Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* **40**, 25-43.
- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A.** (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2074-7.
- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A.** (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**, 1145-8.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-81.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Ferrer, I.** (1988). Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Brain Res* **471**, 167-74.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Martinez-Guijarro, F. J., Blasco-Ibanez, J. M., Luis de la Iglesia, J. A., Bernabeu, A. and Garcia-Verdugo, J. M.** (1992). Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol* **7**, 725-46.
- Lopez-Garcia, C., Tineo, P. L. and Del Corral, J.** (1984). Increase of the neuron number in some cerebral cortical areas of a lizard, *Podarcis hispanica*, (Steind., 1870), during postnatal periods of life. *J Hirnforsch* **25**, 255-9.
- Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H.** (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**, 317-29.
- Lubetzki, C.** (1997). [Multiple sclerosis. Treatment: hopes and realities]. *Presse Med* **26**, 1543-6.

Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-89.

Luskin, M. B. and McDermott, K. (1994). Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia* **11**, 211-26.

M

Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L. et al. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-50.

Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. and Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37**, 751-64.

Margulis, A., Pozdnyakov, N. and Sitaramayya, A. (1996). Activation of bovine photoreceptor guanylate cyclase by S100 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 243-7.

Mariggio, M. A., Fulle, S., Calissano, P., Nicoletti, I. and Fano, G. (1994). The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience* **60**, 29-35.

Marshak, D. R., Pesce, S. A., Stanley, L. C. and Griffin, W. S. (1992). Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging* **13**, 1-7.

Marshall, C. A., Novitch, B. G. and Goldman, J. E. (2005). Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* **25**, 7289-98.

Marshall, C. A., Suzuki, S. O. and Goldman, J. E. (2003). Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* **43**, 52-61.

Mason, J. L., Xuan, S., Dragatsis, I., Efstratiadis, A. and Goldman, J. E. (2003). Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J Neurosci* **23**, 7710-8.

Massari, M. E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-40.

Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T. and Rao, M. S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* **19**, 773-85.

- Melzer, P., Zhang, M. Z. and McKanna, J. A.** (1997). Infraorbital nerve transection and whisker follicle removal in adult rats affect microglia and astrocytes in the trigeminal brainstem. A study with lipocortin1- and S100beta-immunohistochemistry. *Neuroscience* **80**, 459-72.
- Mercier, F., Kitasako, J. T. and Hatton, G. I.** (2002). Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* **451**, 170-88.
- Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17528-32.
- Messier, B., Leblond, C. P. and Smart, I.** (1958). Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res* **14**, 224-6.
- Miller, R. H.** (1996). Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* **19**, 92-6.
- Miller, R. H.** (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* **67**, 451-67.
- Miller, R. H., Hayes, J. E., Dyer, K. L. and Sussman, C. R.** (1999). Mechanisms of oligodendrocyte commitment in the vertebrate CNS. *Int J Dev Neurosci* **17**, 753-63.
- Millward, T. A., Heizmann, C. W., Schafer, B. W. and Hemmings, B. A.** (1998). Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *Embo J* **17**, 5913-22.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Tabkebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K. and Nakafufu, M.** (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-771.
- Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R. and Palmer, T. D.** (2002). Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* **8**, 955-62.
- Moore, B. W.** (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19**, 739-44.
- Morii, K., Tanaka, R., Takahashi, Y., Minoshima, S., Fukuyama, R., Shimizu, N. and Kuwano, R.** (1991). Structure and chromosome assignment of human S100 alpha and beta subunit genes. *Biochem Biophys Res Commun* **175**, 185-91.
- Morshead, C. M., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V. and van Der Kooy, D.** (2003). The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci* **18**, 76-84.

Morshead, C. M. and van der Kooy, D. (1992). Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* **12**, 249-56.

Morshead, C. M. and van der Kooy, D. (2004). Disguising adult neural stem cells. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 125-31.

Most, P., Boerries, M., Eicher, C., Schweda, C., Ehlermann, P., Pleger, S. T., Loeffler, E., Koch, W. J., Katus, H. A., Schoenenberger, C. A. et al. (2003). Extracellular S100A1 protein inhibits apoptosis in ventricular cardiomyocytes via activation of the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem* **278**, 48404-12.

Most, P., Boerries, M., Eicher, C., Schweda, C., Volkers, M., Wedel, T., Sollner, S., Katus, H. A., Remppis, A., Aebi, U. et al. (2005). Distinct subcellular location of the Ca²⁺-binding protein S100A1 differentially modulates Ca²⁺-cycling in ventricular rat cardiomyocytes. *J Cell Sci* **118**, 421-31.

Mrak, R. E. and Griffinbc, W. S. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**, 915-22.

Mrak, R. E., Sheng, J. G. and Griffin, W. S. (1996). Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 273-9.

Mujtaba, T., Piper, D. R., Kalyani, A., Groves, A. K., Lucero, M. T. and Rao, M. S. (1999). Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol* **214**, 113-27.

Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* **271**, 1406-9.

N

Nery, S., Wichterle, H. and Fishell, G. (2001). Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **128**, 527-40.

Neubauer, K., Knittel, T., Aurisch, S., Fellmer, P. and Ramadori, G. (1996). Glial fibrillary acidic protein--a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* **24**, 719-30.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* **29**, 401-13.

Nishikawa, T., Lee, I. S., Shiraishi, N., Ishikawa, T., Ohta, Y. and Nishikimi, M. (1997). Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* **272**, 23037-41.

Nishiyama, A., Watanabe, M., Yang, Z. and Bu, J. (2002). Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* **31**, 437-55.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-20.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K. and Kriegstein, A. R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* **22**, 3161-73.

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**, 136-44.

Novitsch, B., Chen, A. and Jessel, T. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor *olig2*. *Neuron* **31**, 773-789.

O

Olivier, C., Cobos, I., Perez Villegas, E. M., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S. and Thomas, J. L. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* **128**, 1757-69.

Onions, J., Hermann, S. and Grundstrom, T. (1997). Basic helix-loop-helix protein sequences determining differential inhibition by calmodulin and S-100 proteins. *J Biol Chem* **272**, 23930-7.

Ono, K., Bansal, R., Payne, J., Rutishauser, U. and Miller, R. H. (1995). Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* **121**, 1743-54.

Orentas, D. M., Hayes, J. E., Dyer, K. L. and Miller, R. H. (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **126**, 2419-29.

P

Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A. and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-44.

Palmer, T. D., Takahashi, J. and Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**, 389-404.

- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. and Gage, F. H.** (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-94.
- Parnavelas, J. G.** (1999). Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp Neurol* **156**, 418-29.
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafuku, M., Vescovi, A. and Guillemot, F.** (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *Embo J* **23**, 4495-505.
- Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A. and Bonfanti, L.** (1997). Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* **42**, 9-21.
- Perez-Martin, M., Grondona, J. M., Cifuentes, M., Perez-Figares, J. M., Jimenez, J. A. and Fernandez-Llebrez, P.** (2000). Ependymal explants from the lateral ventricle of the adult bovine brain: a model system for morphological and functional studies of the ependyma. *Cell Tissue Res* **300**, 11-9.
- Petrova, T. V., Hu, J. and Van Eldik, L. J.** (2000). Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res* **853**, 74-80.
- Pietas, A., Schluns, K., Marenholz, I., Schafer, B. W., Heizmann, C. W. and Petersen, I.** (2002). Molecular cloning and characterization of the human S100A14 gene encoding a novel member of the S100 family. *Genomics* **79**, 513-22.
- Pixley, S. K. and de Vellis, J.** (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* **317**, 201-9.
- Pozdnyakov, N., Goraczniak, R., Margulis, A., Duda, T., Sharma, R. K., Yoshida, A. and Sitaramayya, A.** (1997). Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): identity with S100beta protein. *Biochemistry* **36**, 14159-66.
- Pringle, N. P. and Richardson, W. D.** (1993). A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* **117**, 525-33.
- Pringle, N. P., Yu, W. P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A. C. and Richardson, W. D.** (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* **177**, 30-42.
- Privat, A.** (1977). The ependyma and subependymal layer of the young rat: a new contribution with freeze-fracture. *Neuroscience* **2**, 447-57.
- Privat, A. and Leblond, C. P.** (1972). The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J Comp Neurol* **146**, 277-302.

Q

Qian, X., Goderie, S. K., Shen, Q., Stern, J. H. and Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* **125**, 3143-52.

R

Raff, M. C., Miller, R. H. and Noble, M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**, 390-6.

Rakic, P. (2003). Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* **43**, 19-32.

Rambotti, M. G., Giambanco, I., Spreca, A. and Donato, R. (1999). S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neuroscience* **92**, 1089-101.

Rao, M. S., Noble, M. and Mayer-Proschel, M. (1998). A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3996-4001.

Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**, 4565-74.

Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1-13.

Richardson, W., Pringle N., Yu, W. and Hall, A. (1997). Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev. Neurosci.* **19**, 58-68.

Rickmann, M. and Wolff, J. R. (1995a). S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett* **186**, 13-6.

Rickmann, M. and Wolff, J. R. (1995b). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* **67**, 977-91.

Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., Thomas, T., Voss, A. K. and Bartlett, P. F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* **412**, 736-9.

Roesler, W. J., Vandenbark, G. R. and Hanson, R. W. (1988). Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* **263**, 9063-6.

Rogister, B., Belachew, S. and Moonen, G. (1999a). Oligodendrocytes: from development to demyelinated lesion repair. *Acta Neurol Belg* **99**, 32-9.

Rogister, B., Ben-Hur, T. and Dubois-Dalcq, M. (1999b). From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **14**, 287-300.

Ross, S. E., Greenberg, M. E. and Stiles, C. D. (2003). Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* **39**, 13-25.

Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessaris, N. and Richardson, W. D. (2002). An 'oligarchy' rules neural development. *Trends Neurosci* **25**, 417-22.

Rowitch, D. (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* **5**, 409-419.

S

Sarnat, H. B. (1992). Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**, 58-75.

Savchenko, V. L., McKanna, J. A., Nikonenko, I. R. and Skibo, G. G. (2000). Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* **96**, 195-203.

Schafer, B. W. and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* **21**, 134-40.

Schafer, B. W., Wicki, R., Engelkamp, D., Mattei, M. G. and Heizmann, C. W. (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**, 638-43.

Scheffler, B., Walton, N. M., Lin, D. D., Goetz, A. K., Enikolopov, G., Roper, S. N. and Steindler, D. A. (2005). Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9353-8.

Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Pledger, W. J. and Van Eldik, L. J. (1991). Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3554-8.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-60.

Shariful Islam, A. T., Nakamura, K., Seki, T., Kuraoka, A., Hirata, K., Emson, P. C. and Kawabuchi, M. (1998). Expression of NOS, PSA-N-CAM and S100 protein in

the granule cell migration pathway of the adult guinea pig forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* **107**, 191-205.

Sheng, J. G., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Kozłowska, E., Van Eldik, L. J. and Griffin, W. S. (1996). Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**, 359-63.

Shi, J., Marinovich, A. and Barres, B. A. (1998). Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci* **18**, 4627-36.

Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. and Inoue, Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* **17**, 9212-9.

Shiraishi, N. and Nishikimi, M. (1998). Suppression of copper-induced cellular damage by copper sequestration with S100b protein. *Arch Biochem Biophys* **357**, 225-30.

Siegel, N., Suhayda, C. and Haug, A. (1982). Aluminum changes the conformation of calmodulin. *Physiol Chem Phys* **14**, 165-7.

Sievers, J., Pehlemann, F. W., Gude, S., Hartmann, D. and Berry, M. (1994). The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP-positive cells in the external granular layer. *J Neurocytol* **23**, 97-115.

Song, H., Stevens, C. F. and Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44.

Sorci, G., Agneletti, A. L. and Donato, R. (2000). Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* **99**, 773-83.

Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. et al. (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* **18**, 8331-43.

Spassky, N., Olivier, C., Cobos, I., LeBras, B., Goujet-Zalc, C., Martinez, S., Zalc, B. and Thomas, J. L. (2001). The early steps of oligodendrogenesis: insights from the study of the plp lineage in the brain of chicks and rodents. *Dev Neurosci* **23**, 318-26.

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* **414**, 98-104.

Stallcup, W. B. and Beasley, L. (1987). Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci* **7**, 2737-44.

Stanley, L. C., Mrak, R. E., Woody, R. C., Perrot, L. J., Zhang, S., Marshak, D. R., Nelson, S. J. and Griffin, W. S. (1994). Glial cytokines as neuropathogenic factors in HIV infection: pathogenic similarities to Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**, 231-8.

Steindler, D. A. and Laywell, E. D. (2003). Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* **43**, 62-9.

Stump, G., Durrer, A., Klein, A. L., Lutolf, S., Suter, U. and Taylor, V. (2002). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev* **114**, 153-9.

Stuve, L. L. and Myers, R. M. (1990). A directly repeated sequence in the beta-globin promoter regulates transcription in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **10**, 972-81.

Sultana, S., Sernett, S. W., Bellin, R. M., Robson, R. M. and Skalli, O. (2000). Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a subset of astrocytes during development. *Glia* **30**, 143-53.

T

Tada, E., Yang, C., Gobbel, G. T., Lamborn, K. R. and Fike, J. R. (1999). Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp Neurol* **160**, 66-77.

Tekki-Kessarlis, N., Woodruff, R., Hall, A. C., Gaffield, W., Kimura, S., Stiles, C. D., Rowitch, D. H. and Richardson, W. D. (2001). Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **128**, 2545-54.

Thomas, J. L., Spassky, N., Perez Villegas, E. M., Olivier, C., Cobos, I., Goujet-Zalc, C., Martinez, S. and Zalc, B. (2000). Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain. *J Neurosci Res* **59**, 471-6.

Timsit, S., Martinez, S., Allinquant, B., Peyron, F., Puelles, L. and Zalc, B. (1995). Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* **15**, 1012-24.

Torii, M., Matsuzaki, F., Osumi, N., Kaibuchi, K., Nakamura, S., Casarosa, S., Guillemot, F. and Nakafuku, M. (1999). Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* **126**, 443-56.

Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* **13**, 580-7.

Treves, S., Scutari, E., Robert, M., Groh, S., Ottolia, M., Prestipino, G., Ronjat, M. and Zorzato, F. (1997). Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* **36**, 11496-503.

U

Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. and Technau, G. M. (1993). A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* **118**, 765-75.

V

Vallstedt, A., Klos, J.M. and Ericson, J. (2005). Multiple dorsoventral origins of oligodendrocytes generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**, 55-67.

Van Hartesveldt, C., Moore, B. and Hartman, B. K. (1986). Transient midline raphe glial structure in the developing rat. *J Comp Neurol* **253**, 174-84.

Vives, V., Alonso, G., Solal, A. C., Joubert, D. and Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* **457**, 404-19.

Voigt, T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* **289**, 74-88.

W

Wegner, M. (2001). Expression of transcription factors during oligodendroglial development. *Microsc Res Tech* **52**, 746-52.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* **18**, 779-91.

Wilder, P. T., Rustandi, R. R., Drohat, A. C. and Weber, D. J. (1998). S100B(betabeta) inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a Ca²⁺-dependent manner. *Protein Sci* **7**, 794-8.

Windrem, M. S., Nunes, M. C., Rashbaum, W. K., Schwartz, T. H., Goodman, R. A., McKhann, G., 2nd, Roy, N. S. and Goldman, S. A. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* **10**, 93-7.

Winningham-Major, F., Staecker, J. L., Barger, S. W., Coats, S. and Van Eldik, L. J. (1989). Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol* **109**, 3063-71.

Wolswijk, G. and Noble, M. (1989). Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* **105**, 387-400.

Woodruff, R. H., Tekki-Kessarlis, N., Stiles, C. D., Rowitch, D. H. and Richardson, W. D. (2001). Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int J Dev Neurosci* **19**, 379-85.

X

Xiong, Z., O'Hanlon, D., Becker, L. E., Roder, J., MacDonald, J. F. and Marks, A. (2000). Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res* **257**, 281-9.

Y

Yamasaki, R., Berri, M., Wu, Y., Trombitas, K., McNabb, M., Kellermayer, M. S., Witt, C., Labeit, D., Labeit, S., Greaser, M. et al. (2001). Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J* **81**, 2297-313.

Yang, Q., Hamberger, A., Hyden, H., Wang, S., Stigbrand, T. and Haglid, K. G. (1995a). S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. *Brain Res* **696**, 49-61.

Yang, Q., Hou, X., Hamberger, A., Wang, S., Dahlstrom, A. and Haglid, K. G. (1995b). S-100 beta immunoreactivity in neurones of the rat peripheral sensory ganglia. *Neuroreport* **6**, 2005-9.

Yang, Q., O'Hanlon, D., Heizmann, C. W. and Marks, A. (1999). Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybrid system and human melanoma. *Exp Cell Res* **246**, 501-9.

Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Azuma, T., Kato, M., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu, M. and Seki, N. (2000). Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 532-7.

Yu, W. P., Collarini, E. J., Pringle, N. P. and Richardson, W. D. (1994). Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* **12**, 1353-62.

Z

Zhang, M. Z. and McKanna, J. A. (1997). Gliogenesis in postnatal rat optic nerve: LC1 + microglia and S100-beta + astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* **101**, 27-36.

Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D. J. (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**, 331-43.

Zimmer, D. B., Chessher, J. and Song, W. (1996). Nucleotide homologies in genes encoding members of the S100 protein family. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 229-38.

Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A. and Song, W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* **37**, 417-29.

Zuckerman, J. E., Herschman, H. R. and Levine, L. (1970). Appearance of a brain specific antigen (th S-100 protein) during human foetal development. *J Neurochem* **17**, 247-51.